



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج
Université Mohamed El Bachir El Ibrahim B.B.A.
كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون
قسم العلوم البيولوجية
Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine Des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie et protection des végétaux

Thème

**Activité antioxydante et antimicrobienne des huiles
essentielles de *Mentha pulegium* L.**

Présenté par : Abou Nabila
Fareh Kholoud

Devant le jury :

Président : M^{me} SIOUDA Wafa. MAA (Univ Mohamed El bachir El Ibrahim BBA)

Encadrant : M^{me} BOUMERFEG Sabah. MCA (Univ Mohamed El bachir El Ibrahim BBA)

Examineur: M^{me} MEZIITI Asma. MAA (Univ Mohamed El bachir El Ibrahim BBA)

Année universitaire : 2016/2017



Dédicace

Je dédier ce modeste travail :

***A** ma mère **FARIDA**: TU M'as la lumière de mes jours, la source de mes efforts, Tu m'as donné ton amour, ta tendresse et toute ton attention. Dans la difficulté tu as toujours été prompte à me venir en aide.*

***A** mon père **KAMEL** : mon soutien moral et source de joie et de bonheur, Merci pour l'éducation que tu as su nous donner et pour tous les efforts auxquels tu as toujours consentis pour nous voir réussir. Merci pour tes encouragements et tes conseils.*

***A** mon très cher mari **IMED**, J'aimerais bien que tu trouves dans ce travail l'expression de mes sentiments de reconnaissance les plus sincères car c'est grâce à ton aide, ta compréhension et ta patience que ce travail a pu voir le jour.*

***Ma zeme** famille mon père Hadj et ma mère Faiza.*

***A** MES SŒURS ET MES CHÈRE : **AFAFE - KHALISSA - NAWALE - ANISSA - RANIA - SOUHILA**.*

- ❖ ***A** MON FRÈRES : **ABD EL GHANI - ABD EL LATIF***
- ❖ ***MES ONCLES ET MES TANTES** : surtout **AYCHA** Merci pour tes encouragements et tes conseils.*
- ❖ ***MON COUSINE** :*
***RACHID** surtout sa femme **MIRA** Merci pour tes encouragements et tes conseils.*
- ❖ ***Mes belles fleurs** : **CHIHAB - RIMAS - ZINO - ABODI - ANIS***
- ❖ *une grande dédicace à tous Mes amis : **YASMINA - NAWAIME - Fatima - WARDIA - AMEL - SAIDA - HASSINA - AMINA - ASMA***
- ❖ ***A** ma Collègue dans ce travail : **kholoud**.*

• *Nabila*





Dédicace

Avec l'aide de bon dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie

A :

Ma famille Fareh et aux personnes les plus chères au monde

Mes chers parents ;

A ma très chère mère Noura ;

Tu es l'exemple de sacrifices et de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Et Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon père Abd El Malek

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est fruit de tes sacrifices qui tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

❖ *A mes sœurs:*

Dalé, Fouziya et son Maris Nouari

❖ *A ma nièce Dounya*

Je te souhaite une belle vie. A mon frère: Madani

❖ *A mes cousins*

Marouane et Habib ; merci pour vôtres aide

A La promotion de zémeannée biochimie LMD. Sans oublier mes amies et a Tous ceux qui ont connus.

• *KHOLOUD*



REMERCIEMENT

*Nous tenons tout d'abord à remercier **ALLAH** le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.*

*Par ailleurs, nous tenons à remercier notre encadrant **Dr. SABAH BOUMERFE** Maitre de conférences au Département des Sciences Biologiques, Faculté d'SNV-STU Université de Bordj-Bou-Arredj pour avoir dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, ses conseils et la confiance qui nous a accordée afin de réaliser ce travail.*

*Nous tenons à remercier Mademoiselle la doctorante **Faiza Baali***

Merci pour votre patience et votre aide. Nous vous souhaitons beaucoup de succès dans votre vie professionnelle et personnelle.

*J'exprime mes vifs remerciements à M^{me} **SIOUDA Wafa** pour sa précieuse aide et ses conseils, et pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury.*

*Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à M^m **MZIITI Asma** pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.*

Nous avons le plaisir d'adresser mes vifs remerciements à ;

Tous nos enseignements

*Equipe de laboratoire particulièrement : **Khalil, wassima, wahiba et fouad**
Nous tenons à remercier respectivement tous ceux qui nous ont aidés, soutenues, et encouragées pour la réalisation de ce modeste travail.*

Résumé

Notre travail porte sur l'étude des activités biologiques des huiles essentielles (HES) de la menthe pouliot (*Mentha pulegium* L.) de la région de Bordj Bou Arreridj.

Mentha pulegium L. provenant de la région de Bordj Bou Arreridj a fait l'objet d'un décryptage biologique de ses huiles essentielles. Cette plante appartient à la famille des lamiacées ; la famille la plus importante dans la flore algérienne et la plus utilisée par les thérapeutes traditionnels.

L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation a donné un rendement de $0.64 \pm 0.01\%$.

L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH, en comparant avec l'antioxydant de référence BHT ($IC_{50} = 29 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ et AAI = 1.35) les résultats montrent que les huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. ont une activité antioxydante modérée dont IC_{50} égale à $6.7 \pm 0.28 \text{ mg/ml}$ et un AAI de 0.005.

L'étude du pouvoir antibactérien *in vitro* par la méthode de diffusion des disques a démontré une bonne activité antibactérienne contre les souches testées soit bactériennes (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *M. luteus*, *S. aureus*, *B. subtilis*) soit fongique (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Fusarium moniliforme*).

Ces résultats peuvent être considérés comme point de départ pour des applications de cette plante en santé ou dans le secteur agroalimentaire

Mots clés : *Mentha pulegium* L., les huiles essentielles, activité antioxydante, activité antibactérienne, activité antifongique.

ملخص

الهدف من هذا البحث هو دراسة النشاطية البيولوجية للزيوت الأساسية لنبات الفليو *Mentha pulegium* من منطقة برج بو عريريج. هو نبات عطري ينتمي إلى عائلة الشفويات يدعى محليا بالفليو. ينمو بصورة تلقائية وهو منتشر بكثرة في الجزائر و في الطب التقليدي

تم استخلاص الزيوت الأساسية عن طريق عملية التقطير بالبخار hydrodistillation، و التي اعطت مردود يساوي 0.01 ± 0.064 .

تم تقييم النشاطية المضادة للأكسدة باستعمال تقنية DPPH حيث بينت النتائج ان الزيوت الاساسية المستخلصة *pulegium menthaL* ذات نشاطية معتدلة ب ($IC_{50} = 6,7 \pm 0.28$ mg/ml و $AAI = 0.005$) مقارنة ب BHT ($IC_{50} = 29 \pm 0.13$ mg/ml ; $AAI = 1.35$).

اظهرت الدراسة ان لهذه الزيوت نشاطية كبيرة مضادة للبكتيريا المختبرة و المتمثلة في *Escherichia coli* و *Micrococcus luteus* و *Staphylococcus aureus* ; *Bacillus subtilis* ; *Pseudomonas aeruginosa* وذلك باستعمال طريقة الانتشار في وسط هلامي حيث لوحظ ان هذا التأثير مرتبط بالتركيز.

من جهة أخرى بينت النتائج باستعمال طريقة الاحتكاك المباشر ان للزيوت الاساسية نشاطية مضادة للفطريات التالية *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus* ; *Fusarium moniliform*.

الكلمات المفتاحية : *Mentha puleguim L*، الزيوت الأساسية، النشاط المضاد للأكسدة، النشاطية المضادة للبكتيريا، النشاطية المضادة للفطريات.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale..... 01

Chapitre I : synthèses bibliographique

I.1. Monographie de *Mentha pulegium* L..... 03

I.1.1. Étymologie..... 03

I.1.2. Position systématique 03

I.1.3. Description botanique 03

I.1.4. Aire de répartition..... 04

I.1.5. Utilisation en médecine traditionnelle..... 04

I.1.6. La composition chimique de l'huile essentielle..... 05

I.2. Les huiles essentielles..... 06

I.2.1. Généralités..... 06

I.2.2. Origine des huiles essentielles..... 06

I.2.3. Localisation des huiles essentielles dans la plante..... 06

I.2.4. Composition chimiques des huiles essentielles..... 07

I.2.5. Activités biologiques des huiles essentielles..... 08

I.2.5.1. Activité antimicrobienne..... 08

I.2.5.1.1. Activité antibactérienne..... 09

I.2.5.1.2. Activité antifongique..... 09

I.2.5.1.3. Mécanismes d'action..... 09

I.2.5.2. Activité antioxydante..... 10

I.2.5.2.1. Le stress oxydatif.....	10
I.2.5.2. 2. Les radicaux libres.....	10
I.2.5.2. 3.Les conséquences de stress oxydatif.....	10
I.2.5.2. 4. Les antioxydants.....	11
I.2.6. Application des huiles essentielles dans l’industrie agroalimentaire.....	11
I.2.7. Toxicité des huiles essentielles.....	12

Chapitre II : Matériel et Méthodes

II.1.Matériel.....	13
II.1.1. Matériel biologique.....	13
II.1.1.1. Matériel végétal.....	13
II.1.1.2. Microorganismes utilisés.....	13
II.1.2. Matériel non biologique.....	14
II.2. Méthodes.....	14
II.2.1. Extraction des huiles essentielles.....	14
II.2.2. Caractères organoleptiques des huiles essentielles	15
II.2.3. Détermination du taux d’humidité.....	15
II.2.4. Activités biologiques des huiles essentielles.....	16
II.2.4.1. Activité antioxydante.....	16
II.2.4.1.1.Test de DPPH.....	16
II.2.4.2. Activité antimicrobienne.....	19
II.2.4.2.1. L’activité antifongique	19
II.2.4.2.2. L’activité antibactérienne	20
II.3. Analyses statistiques.....	23

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1. Extraction des huiles essentielles	24
III.2. Taux d'humidité.....	25
III.3. Caractères organoleptiques.....	25
III.4. Activités biologiques	26
III.4.1. Activité antioxydante.....	26
III.4.2. Activité antimicrobienne.....	29
III.4.2.1. Activité antibactérienne.....	29
III.4.2.2. L'activité antifongique.....	35
Conclusion et perspective.....	38

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Représentation schématique et photo de <i>Mentha pulegium</i> L	04
02	Structure de la molécule d'isoprène	07
03	Montage d'un hydrodistillateur type Clevenger	15
04	Structure : chimique du radical libre DPPH•	17
05	Piégeage du radical libre DPPH	17
06	Le taux d'humidité et la matière sèche de <i>M. pulegium</i> L.	25
07	Activité anti-radicalaire des l'HES de <i>M. pulegium</i> L.	27
08	Activité anti-radicalaire de BHT	27
09	IC ₅₀ en µg/ml des HES des <i>L. steochas</i> L. et du standard (BHT).	28
10	l'effet antimicrobien des huiles essentielles de <i>M. pulegium</i> L.	33
11	L'ffet des huiles essentielles de <i>M. pulegium</i> L. sur les souches testées	35
12	l'effet antifongique des huiles essentielles de <i>M. pulegium</i> L.	36

Liste des Tableaux

N^o	Titre	page
I	Répartition des souches testées	14
II	Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition pour des disques imprégnés de 10 µl des huiles essentielles	23
III	Rendement en HES de <i>M. pulegium</i> L.	24
IV	Caractéristiques organoleptiques des HES de <i>M. pulegium</i> L	25
V	Activité antioxydante des huiles essentielle de <i>M. pulegium</i> L.	28
VI	Les zones d'inhibition de la croissance microbienne par les antibiotiques exprimée en mm (moyenne ± SD), transcrite en sensibilité	31
VII	Les zones d'inhibition de la croissance microbienne par les HES exprimée en mm (moyenne ± SD), transcrite en sensibilité	32

Liste des abréviations

AA(%) : Activité antioxydante.

AAI : Indice de l'activité antioxydante.

Abs : Absorption.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

ATCC : American Type Culture Collection (catalogue de microorganismes)

BHT : Butyl hydroxy toluène.

CHL : Chloramphénicol.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

DMSO : dimethyl sulfoxide.

DO : Densité optique.

DPPH: 2, 2 -diphényl -1- picrylhydrazyl.

GM: Gentamicine.

HE : Huile essentielle.

IC₅₀ : Concentration à 50% de DPPH perdu.

MH : Muller Hinton.

A : Potato Dextrose Agar.

PI% : Pourcentage d'inhibition.

OFL : Ofloxacin.

Rdt: Rendement.

SD : Déviation standard.

UFC: Units Forming Colony

Introduction
Générale

Introduction Générale

L'histoire des Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales (PPAM) est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples, montre que les plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. L'homme utilise les plantes depuis des milliers d'années, pour traiter divers maux. Le monde végétal est à l'origine d'un grand nombre de médicaments (**Lahrech, 2010**). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80 % des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire (**O.M.S, 2002**).

Actuellement, plusieurs questions sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire. En effet, la peroxydation des lipides au cours des processus de fabrication et de stockage des aliments sous l'action des radicaux libres conduit à la perte de la qualité et de la sécurité des aliments. Les antioxydants de synthèse, généralement utilisés en industrie alimentaire pour retarder l'oxydation des lipides, sont suspectés d'avoir des effets néfastes sur la santé du consommateur (**Ames, 1983 ; Wang et al., 2008**). De plus, l'usage excessif d'agents antibactériens et antifongiques chimiques dans la médication humaine ainsi que dans l'élevage animal et la conservation des aliments conduit au développement de microorganismes résistants à la plupart des antibiotiques (**Essawi et Srour, 2000**). Suite à cette préoccupation, il semble donc important de trouver une alternative. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre ces phénomènes de résistance bactérienne et d'oxydation des aliments. Dans ce but, l'utilisation des plantes représente un potentiel inestimable pour la recherche de nouvelles substances à pouvoir antimicrobien et/ou antioxydant (**Bruneton, 1999**). Ces plantes aromatiques ont l'aptitude à synthétiser de nombreux métabolites secondaires. Ces métabolites possèdent diverses propriétés biologiques. Les huiles essentielles ou essences, font partie de ce groupe de métabolite avec les alcaloïdes et les phénols (**Haddouchi et al., 2009**). Ces huiles se composent d'un certain nombre de composés de différentes origines biosynthétiques s'étendant des hydrocarbures terpénoïdes aux composés de soufre, et de tels composés sont naturellement présents dans différentes concentrations (**Silva et al ; 2015**).

Les plantes aromatiques sources des huiles essentielles sont largement répandues dans la nature. L'Algérie abrite un ensemble d'espèces importantes et variées et témoigne de ce fait d'une richesse floristique incontestable. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à étudier

Introduction Générale

la Menthe pouliot ; une plante qui pousse à l'état spontané dans la région de Bordj Bou Arreridj. Menthe pouliot (*Mentha pulegium* L.) fait l'objet des récentes recherches dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires. C'est une herbe aromatique de la famille des Labiées, appréciée pour ses propriétés aromatiques, antioxydantes, antimicrobiennes, expectorantes, carminatives et antispasmodiques dans le traitement du rhume, la bronchite, la tuberculose, la sinusite, le choléra, les intoxications alimentaires, les flatulences et les coliques intestinales (Zargari, 1990 ; Delille, 2007).

Ce travail a pour objet de l'extraction et l'évaluation de l'activité biologique des huiles essentielles de la plante *Mentha pulegium* L.

- Le premier chapitre propose une recherche bibliographique comprend deux volets :
 - ✓ Le premier volet est consacrée à l'étude de *Mentha pulegium* L., sa description botanique, sa systématique, sa composition chimique ainsi que ses utilisations en médecine traditionnelle.
 - ✓ Le second volet donne un aperçu sur les huiles essentielles: composition, localisation, répartition, procédés d'extraction et activités biologiques.
- Le second chapitre met en évidence le matériels et les méthodes utilisés lors de la réalisation de cette étude, tels que la méthode d'extraction des huiles essentielles l'évaluation de l'effet antifongique, l'effet antibactérien et l'effet antioxydant *in-vitro* en utilisant le test DPPH. Par la suite une analyse statistique a été réalisée permettant de regrouper et de résumer un ensemble de données ayant des objectifs comparables.
- Le troisième chapitre présent et discute les résultats obtenus suivie par une conclusion qui fait une synthèse claire des principaux apports du mémoire en termes de méthodologies proposées et des résultats produits. De nombreuses perspectives importantes qui font suite à ce travail

Chapitre 01

Synthèse bibliographique

I.1. Monographie de *Mentha pulegium* L.

I.1.1. Étymologie

Le nom de « pouliot » vient du latin *pulegium*, qui dérive de *pulex* : la puce ; la plante ayant la propriété d'éloigner les puces (**Gamisans et Jeanmonod, 1993**). La menthe pouliot, connue sous le nom vernaculaire arabe de « fliyou », est largement utilisée en médecine populaire dans de nombreuses cultures (**Agnihotri et al., 2005**). Elle est représentée par deux sous espèces: *Mentha pulegium ssp. vulgaris* et *Mentha pulegium ssp. pulegium* (**Quézel et Santa, 1962**). Cette dernière fera l'objet de notre étude.

I.1.2. Position Systématique

Selon **Quezel et Santa (1963)** ; **Guignard et Dupont (2004)**, la classification qu'occupe *Mentha pulegium* L. dans la systématique est la suivante:

Règne	Plantes
Embranchement:	Phanérogames ou Spermaphytes
Sous-embranchement:	Angiospermes
Classe	Eudicots
Sous-classe	Astéridées
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Mentha</i> (Tourn.) L.
Espèce	<i>Mentha pulegium</i> L.

Nom vernaculaire algérien : fliyou; **Français :** La menthe pouliot.

I.1.3. Description botanique

La famille des lamiacées connue également sous le nom des labiées, comporte environ 258 genres pour 6900 espèces plus ou moins cosmopolites ; mais dont la plus part se concentrent dans le bassin méditerranéen (**Botineau, 2010**). Le genre *Mentha* comprend 25-30 espèces présentes dans le monde (**Dorman et al., 2003**).

Les Menthes sont des plantes vivaces, herbacées indigènes et très odorantes appartenant à la famille des labiacées (**Jahandiez et Marie, 1934**). Elles conservent depuis l'antiquité une infinie diversité d'emplois et occupent une large place dans la thérapeutique (**II Edrissi, 1982**).

Mentha pulegium L. est une plante à tiges dressées, Sa saveur est fortement aromatique et son odeur est intense. Les tiges à section carrée, sont plus ou moins dressées, verdâtres ou grisâtres, très ramifiées. Les feuilles, opposées et petites, sont ovales ou oblongues presque entières (légèrement dentelées ou crénelées) et munies d'un court pétiole. C'est une plante glabre de 10 - 30cm à inflorescences formées de nombreux verticillatres denses, feuillés et distants (**Queze Sauta, 1963**).

Les fleurs, qui apparaissent l'été, de Mai à fin Septembre, sont rose lilas, parfois blanches, et sont groupées à l'aisselle des feuilles en glomérules largement espacés le long de la tige (**Queze Sauta, 1963**).

Le calice est à cinq dents pileuses, à gorge obstruée de poils à la maturation. La corolle est à gorge pileuse, bossée d'un côté à la gorge (**Raybaud, 1985**). (Figure01).



Figure 01. Représentation schématique et photo de *Mentha pulegium* L. (**Amina, 2015**).

I.1.4. Aire de répartition

M. pulegium L. est très répandue dans l'aire méditerranéenne, elle est connue sous le nom de « menthe pouliot ». Et fréquente dans les milieux humides et elle est parfois cultivée comme plante condimentaire pour ses feuilles très aromatiques. C'est une espèce spontanée dans l'ensemble de l'Europe, l'Asie, l'Amérique et le nord de l'Afrique (du Maroc à l'Égypte). (**Gamisans et Jeanmonod, 1993**).

En Algérie, *Mentha pulegium* L. est très abondante et pousse spontanément (**Quézel et Santa, 1963**). Elle se rencontre dans les zones humides et généralement marécageuses, près des routes, et elle est plus abondante dans les pâturages de montagnes (**Chalchat et al., 2000**).

I.1.5. Utilisation en médecine traditionnelle

Il semble que dans le temps des enceins elle était méconnue, utiliser uniquement pour former des couronnes qu'ils portaient lors des cérémonies religieuses, par contre les chinois

connaissaient ses propriétés calmantes antispasmodiques, Hippocrate la considérait comme excitante alors que Pline à constater son effet antalgique (**Kebissi, 2004**).

Ingestion (troubles digestif) et insuffisance biliaire : La menthe pouliot combat l'ingestion et rétablit les troubles gastriques comme les crampes et les gaz intestinaux, elle est carminative excellents contre les ballonnements, elle est également cholagogue : efficace contre les brulements d'estomac (stomachique). (**Baba Aissa, 2000**).

Les parties aériennes fleuries de cette plante sont traditionnellement utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes, expectorantes, carminatives et antispasmodiques dans le traitement du rhume, la bronchite, la tuberculose, la sinusite, le choléra, les intoxications alimentaires, les flatulences et les coliques intestinales (**Zargari, 1990 ; Delille, 2007**).

Cette plante a aussi la particularité d'être insecticide puisqu'elle a été déjà utilisée dans ce ses pour faire éloigner les insectes. (**Bremness, 2001**).

En usage externe, la menthe pouliot fraîche est appliquée sur les contusions, les enflures, les engorgements laiteux, les points douloureux des rhumatismes et en compresses contre la névralgie faciale et la migraine (**Hyerisam, 2013**).

La plante entière, s'utilise en inhalation, en infusion ou en décoction dans du lait ou du thé, est conseillé en cas de refroidissements, de rhume, de grippe, de bronchite, de toux et de douleurs abdominales (**Gardès et al., 2003**).

I.1.6. Composition des huiles essentielles du *Mentha pulegium* L.

La composition chimique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. a fait l'objet de nombreuses publications. Elle est caractérisée par la présence majoritaire de cétones possédant un squelette menthanique. En effet, les compositions décrites sont dominées soit par la pulégone 80,3% au Maroc (**Bouchra et al., 2003**), (70-90%) en Algérie (**Beghidja et al., 2007. Lahrech, 2010**), 65,9-83,1% en Inde (**Agnihotri et al., 2005**), 73,4% en Uruguay (**Lorenzo et al., 2002**) et 43,5% en Egypte (**El-Ghorab, 2006**); soit par la pipériténone 83,7-97,2% en Grèce (**Kokkini et al., 2002**) ou encore la pipéritone 70,0% en Autriche (**Zwaving et Smith, 1971**).

I.2. Les Huiles essentielles

I.2.1. Généralités

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, isolés par hydrodistillation ou par expression mécanique (**Kalembe, 2003**). Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs de brindilles, d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits (**Burt, 2004**).

Selon l'association Française de normalisation (**AFNOR, 2000**). Les huiles essentielles sont des produits obtenus à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation à sec. De nouvelles techniques permettant d'augmenter le rendement de production, ont été développées, comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute pression (**Santoyo et al., 2005**), ou l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes (**Kimbaris et al., 2006**).

I.2.2. Origine des huiles essentielles

les plantes vertes puisent l'eau et utilisent l'énergie solaire et le gaz carbonique présent dans l'air pour synthétiser les glucides, ce processus appelé photosynthèse, il se déroule au niveau des feuilles, plus précisément au niveau des chloroplastes qui renferment la chlorophylle, les produits issus de la photosynthèse sont (les glucides, NADPH, ATP) constituent une source d'énergie, ils contribuent à la génération de nouvelles cellules, ils interviennent indirectement dans la biosynthèse de divers composés secondaires tels que les lipides, les hétérosides, et les essences. Ainsi les huiles font parties des résidus du métabolisme végétale (**Narishetty et Panchagnula, 2004**).

I.2.3. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les essences sont synthétisées par les végétaux supérieurs. Il y aurait environ 17500 espèces aromatiques réparties dans cinquante de famille dont les Lamiaceae, les Asteraceae, les Rutaceae, et les Lauraceae. Ces espèces sont caractérisées par la présence d'organes spécifiques responsables de la synthèse et de stockage des huiles essentielles :

Les poches (Myrtacées, Rutacées) ou les canaux sécréteurs, les poils sécréteurs (Lamiaceae) et les cellules sécrétrices (Zingiberaceae) (**Bruneton, 1993**).

Sur le site de stockage, les gouttelettes des huiles essentielles sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air (**Bruneton, 1993 ; Anton et Lobstein, 2005**).

I.2.4. Composition chimique des huiles essentielles

la composition chimique des essences est complexe et peut varier selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturales, et le mode d'extraction. (**Guignard, 2000**).

Les constituants des huiles essentielles appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpenoïdes (terpènes) d'une part, le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane. beaucoup moins fréquents d'autre part, tous caractérisés par un poids moléculaire bas (**Bakkali et al., 2008**).

a. Les terpénoïdes :

Ils représentent le groupe le plus diversifié des métabolites secondaires, végétaux, plus de 15.000 composés différents sont décrits dans la littérature. Ils dérivent d'une structure de base à cinq carbones (C₅H₈), communément appelée isoprène (Figure 2). Selon le nombre répétitif de cette unité, les terpénoïdes sont classés en : monoterpénoïdes (C₁₀), sesquiterpénoïdes (C₁₅) et diterpénoïdes (C₂₀). Dans la composition de la plupart des huiles essentielles les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes forment la majeure partie, (**Calsamiglia et al., 2007. Benchaar et al., 2008.**)

Le terme « terpénoïde » définit l'ensemble des terpènes oxygénées et non oxygénées, alors que le terme « terpène » ne tirent pas compte de la présence d'oxygène (**Baser et buchbauer, 2010**)

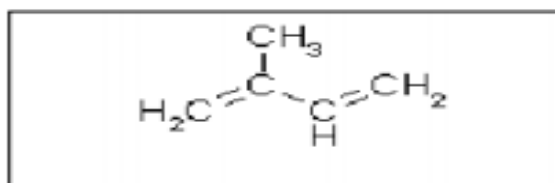


Figure 2. Structure de la molécule d'isoprène (**Calsamiglia et al., 2007**)

b. Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C6-C3), ou composés phénoliques s'agissant le plus fréquemment d'allyl ou propénylphébols, et ou aldéhydes. La biosynthèse par voie phenylpropanoïdes débute par des aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine, Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle. Egalement, la synthèse de ces constituants nécessite une série d'acides dont l'acide shikimique et l'acide cinnamique (**Bruneton, 1999**).

Les phénylpropanoïdes sont moins répondu dans l'HE que les terpènes, néanmoins elles sont caractéristiques dans certaines huiles essentielles d'Apiaceae (anis, fenouil, persil, cannelles (eugénole, myristicine, asarones, cinnamaldéhyde) (**Bruneton, 1999**).

I.2.5. Activités biologiques des huiles essentielles

Les H.E.S. possèdent de nombreuses activités biologiques. Selon les travaux de **Vagi, et al, (2005)** ces activités sont liées essentiellement à la composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires de ces extraits et à leurs effets synergiques

I.2.5.1. Activité antimicrobienne

L'essor de chimie a permis l'apparition de nouvelles substances antimicrobiennes. Ces dernières sont définies comme étant des substances utilisées pour détruire les microorganismes ou empêcher leurs croissances, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériennes et antifongiques. Ces substances synthétiques ont été employées couramment. (**Rozman et Jersek, 2009**).

Néanmoins, le mécanisme d'action des HES sur les cellules bactériennes et fongiques reste difficile à cerner, compte tenu de la composition complexe des huiles volatiles (**Burt, 2004**). La variabilité des constituants des huiles suggère qu'elles agissent sur plusieurs sites d'action dans les micro-organismes, étant donné que chaque composé possède son propre mode d'action (**Guinoiseau, 2010**).

En effet, les huiles essentielles (HEs) sont connues pour posséder une activité antimicrobienne et certaines sont classées comme des substances sûres et pourraient donc être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants. (**Gachkar et al., 2007**).

I.2.5.1.1. Activité antibactérienne

Les molécules aromatiques possédant l'activité antibactérienne la plus importante sont les Phénols, les terpènes ou terpénoïdes ont aussi des effets contre les bactéries et différents autres germes causant des problèmes dans le domaine médicale et agroalimentaire. Cependant le mécanisme de l'action de ces terpènes n'est pas entièrement compris et qu'il peut être s'agit de la rupture de la membrane par les composés lipophiles (**Cowan, 1999**).

I.2.5.1.2. Activité antifongique

De plus en plus, les essences sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire comme aromes également comme conservateurs alimentaires. Les huiles essentielles agissent sur un large spectre de moisissure et de levure en inhibant la croissance des levures et la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures (**Ouibrahim, 2014**).

Comme pour l'activité antibactérienne, le pouvoir antifongique est attribué à la présence de certaines fonctions chimiques dans la composition des HES, Plusieurs travaux ont révélé que le pouvoir inhibiteur était essentiellement dû à la réactivité de la fonction aldéhyde avec le groupement thiol des acides aminés impliqués dans la division cellulaire (**Kurita et al., 1979**).

D'autres auteurs ont démontré que la formation d'un complexe entre le donneur d'électrons et l'aldéhyde induit un changement de l'état ionique de la membrane traduisant par un déséquilibre d'échange avec le milieu extérieur. Ce déséquilibre entraîne la mort cellulaire (**Baser et Buchbauer, 2010**).

I.2.5.1.3. Les mécanismes d'action

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement en fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (**Sipailiene et al., 2006**).

Les mécanismes impliqués dans le mode d'action antimicrobien des huiles essentielles ne sont pas encore totalement éclaircis. Leur action peut être inhibitrice ou létale. Elles peuvent affecter plusieurs cibles en même temps et leur mécanisme d'action est probablement n'est pas attribué à un mécanisme spécifique considérant la grande variété des groupes de

constituants chimiques présentes dans une huile essentielle et les différents sites dans la cellule ou elles peuvent agir (**Burt, 2004; Bakkali et al., 2008**).

I.2.5.2. Activité antioxydante

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol, la quercétine, la rutine et le Picnogénol.

La plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyyles ($\text{OH}\cdot$) et superoxydes ($\text{O}_2\cdot$) (**Burda et Oleszek, 2001; Antolovich et al., 2002 ; Bartosz, 2003**).

La capacité antioxydante des huiles essentielles est étroitement liée à tout le contenu phénol (**Yanishlieva et al., 1999**).

I.2.5.2.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène(ERO) et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (**Boyd et al., 2003**).

I.2.5.2.2. Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, donc très réactifs et, par conséquent, leur durée de vie est généralement très courte, de l'ordre de 4-10 secondes, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron (**André, 1998, Beckman ; Ames, 1998**).

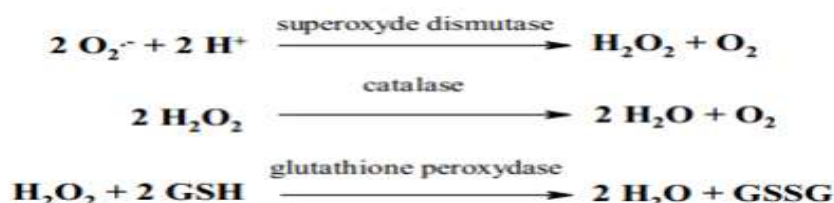
I.2.5.2.3. Conséquences de Stress oxydatif

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles. La conséquence de ce déséquilibre va entraîner une agression appelée « stress oxydatif » (**Rahman, 2003**).

Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN (Aurousseau, 2002 ; Valko *et al.*, 2006). Toutes ces altérations augmentent le risque de plus de 30 processus de différentes maladies (Aruoma, 1998). Parmi lesquelles les maladies d'Alzheimer de Parkinson, de Creutzfeldt Jacob et de méningo-céphalites, les maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque (Jha *et al.*, 1995), les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (Georgetti *et al.*, 2003) et le cancer (Ali *et al.*, 2003).

I.2.5.2.4. Les antioxydants

Ce sont des molécules qui aident le corps à lutter contre les radicaux libres en les neutralisant, afin qu'ils deviennent inoffensifs (Lévy-Dutel et Scotto, 2011), ils peuvent être classés en deux groupes selon le niveau de leur action : les antioxydants primaires qui sont appelés également les antioxydants vrais ou antioxydants radicalaires (Reynal et Multon, 2009). Ce sont Des enzymes antioxydantes présentent des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (glutathion et ascorbate) (Favier, 2006). Ces enzymes antioxydantes permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes:



De ce fait elles préviennent la formation de radicaux libres organiques à partir des lipides membranaires notamment et contribuent donc à la protection des membranes de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003). Et les antioxydants secondaires. Les antioxydants qui sont appelés aussi préventifs qui assurent l'inhibition de la production des radicaux libres. Ce sont des molécules exogènes ; des substances décomposant les hydro-péroxydes en alcools, des thiols (glutathion, acides aminés soufrés) ou des disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV (Rolland, 2004), Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes (Dacosta, 2003).

I.2.6. Applications des huiles essentielles dans l'industrie agroalimentaire

Les effets antimicrobiens de différentes espèces d'herbes et d'épices sont connus depuis longtemps et mis à profit pour préserver les aliments (Bekhechi, 2008). Ainsi, les huiles essentielles et leurs composants, actuellement employés comme arômes alimentaires,

sont également connus pour posséder des activités antioxydantes et antimicrobiennes sur plusieurs bactéries responsables de la pollution des aliments et pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires (**Kim et al., 1995**).

Les huiles essentielles ont également des propriétés fongicides (**Mahadevan, 1982**) et très efficaces contre les moisissures responsables de la détérioration des denrées alimentaires lors de leur stockage (**Mejholm & Dalgaard, 2002**). Les huiles essentielles extraites des feuilles des plantes aromatiques ont également révélé des propriétés insecticides très intéressantes contre une grande variété d'insectes ravageurs des stocks des denrées alimentaires (**Tapondjou et al., 2003 ; Kellouch, 2005**).

I.2.7. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Certaines d'entre elles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de citrus contenant des furacoumarines), d'autres ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' α -thujone). La toxicité des huiles essentielles est assez mal connue. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi (**Guba, 2001**).

L'utilisation des HES doit être avec prudence, elle risque les spasmes et la goutte. La prise simultanée des médicaments homéopathiques avec la menthe est contre-indiquée. (**Aouadhi, 2010**).

Chapitre 02

Matériel et Méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Matériel végétal

Récolte, identification et conservation

La plante *Mentha pulegium* L. a été récoltée durant la période Mars-Avril, 2017, de la région de Bordj Bou Arreridj,

L'identification botanique de l'espèce a été effectuée par le botaniste Mr SARRI Djamel au niveau du département des sciences de la nature et de la vie, Université de Mohammed Boudiaf M'sila.

La plante fraîchement collectée a été séchée à l'abri de la lumière et dans un endroit sec et aéré à température ambiante.

II.1.1.2. Microorganismes utilisés

Les souches utilisées dans notre étude font partie de deux groupes des microorganismes pathogènes et microorganisme contaminant. Les testes sont réalisés sur trois souches fongiques et cinq souches bactériennes.

a. Souche bactériennes

Le choix des microorganismes a été porté sur cinq souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) fréquentes en pathologie humaine. Certaines d'entre eux sont souvent responsables de toxi-infections alimentaires constituant ainsi un problème majeur de santé publique, et sont caractérisées par leur résistance naturelle à divers agents antimicrobiens (Tab I).

Nous avons sélectionné deux groupes de bactéries :

- Des bactéries Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 65 38, *Bacillus subtilis* ATCC 66 33.
- Des bactéries Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 90 27, *Escherichia coli* ATCC 87 39, *Micrococcus luteus* ATCC 469.

Ces souches nous ont été fournies aimablement par les responsables du laboratoire de Microbiologie du complexe Antibiotical SAIDAL de Médéa, et de l'Institut Pasteur.

Tableau I. Répartition des souches testées

Bactérie	Souche	Code	Famille
Gram -	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 87 39	Enterobacteriaceés
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 90 27	Pseudomonadacées
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 469	Micrococacées
Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 65 38	Staphylococcacées
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 66 33	Bacillacées

b. Souche fongiques

Les trois souches fongiques testées *Fusarium moniliform*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* dans le présent travail sont provenues du laboratoire de microbiologie de département des Sciences de la Nature et de la Vie (SNV) à l'Université de Mohamed Boudiaf de M'sila.

c. Conservation des souches

La conservation des souches a été réalisée par ensemencement des souches isolées sur gélose nutritive inclinée dans des boîtes de pétri, les cultures pures sont conservées à + 4°C à l'obscurité.

II.1.2. Matériel non biologique

Des antibiotiques ont été utilisés comme références (témoins positifs). Les équipements, la verrerie et les milieux de culture utilisés sont mentionnés dans l'Annexe 1.

II.2. Méthodes

II.2.1. Extraction des huiles essentielles

II.2.1.1. Principe

L'hydrodistillation ou entraînement à la vapeur, est une technique d'extraction dans laquelle le solvant est l'eau. Le principe consiste à porter à ébullition dans un ballon un mélange d'eau et de plante dont on souhaite extraire l'huile essentielle. Les cellules végétales

éclatent et libèrent les molécules odorantes, lesquelles sont alors entraînées par la vapeur d'eau créée. Elles passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis sont récupérées dans un récipient (**Bruneton, 1999**).

II.2.1.2. Mode opératoire

Dans notre étude, l'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation des échantillons dans un appareil de type Clevenger (**Clevenger, 1928**) au niveau du laboratoire de biochimie du département de Biochimie et microbiologie de l'université de M'sila. La distillation de 100 g de chaque échantillon découpés en morceaux de 3 cm environ dure trois heures après l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur (Figure 3). Les huiles essentielles ont été stockées à 4°C à l'obscurité et déshydratées avec du sulfate de sodium anhydre.

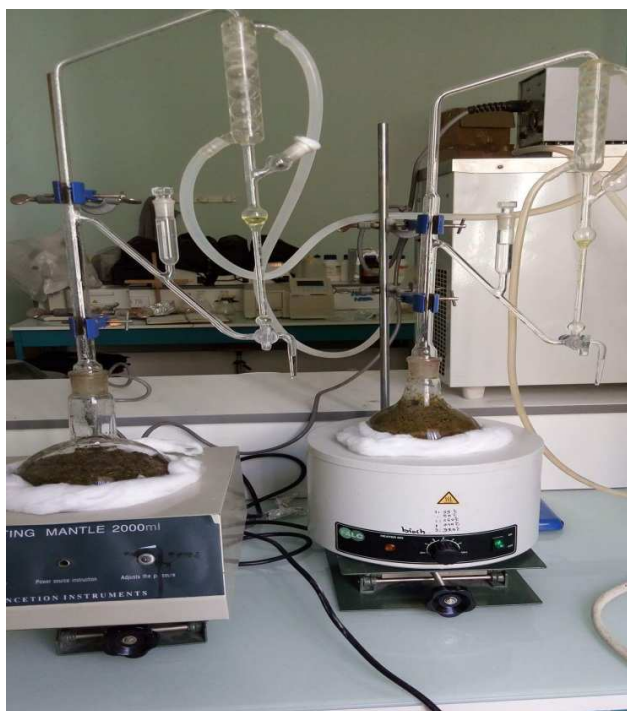


Figure 3. Montage d'un hydrodistillateur type Clevenger (**Originale, 2017**).

Le rendement en huile essentielle RHE correspond au rapport entre la masse des HES (m_{HES}) obtenue et la masse de matière végétale (m_{MV}) utilisée pour l'extraction (**AFNOR, 2000**). Il est exprimé en pourcentage. Il est estimé par la formule suivante :

$$R_{HES} \% = \frac{m_{HES}}{m_{mv}} * 100$$

R_{HES}: Rendement de l'extraction des HES en pourcentage (%).

M_{HE} : Masse de l'HE récupérée en gramme (g).

M_{mv} : Masse d'essai de la matière végétale sèche utilisée en gramme (g).

II.2.2. Caractères organoleptiques

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) des huiles essentielles de *Mentha puleguim* L., ont été notées.

II.2.3. Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité ou la teneur en eau est définie comme étant la perte de poids subit lors de la dessiccation (Audigié et al., 1978) et a été déterminée par le procédé de séchage dans l'étuve à 105°C, 4g de la matière fraîche été étuvé pendant 4 heure ; trois répétitions ont été réalisées, dont la moyenne représenterait le taux d'humidité (Twidwell et al., 2002 ; Simpson, 1999). qui a été calculé par la formule suivante:

$$H\% = (\text{Poids } \alpha - \text{Poids } \beta) / \text{Poids } \alpha \times 100$$

H% : taux d'humidité exprimé en %.

α : Poids de l'échantillon « plante fraîche » en g.

β : Poids de l'échantillon « plante sèche » en g.

II.2.4. Activités biologiques des huiles essentielles

II.2.4.1. Activité antioxydante

II.2.4.1.1. Teste de DPPH

a. Principe

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété anti radicalaire, entraînant ainsi une décoloration (Figure 04). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002).

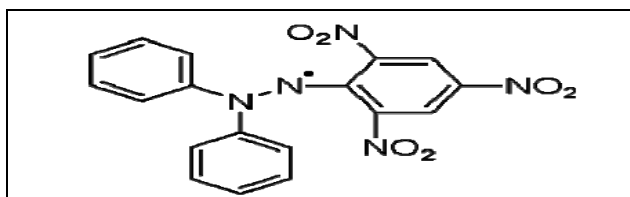


Figure 04. Structure : chimique du radical libre DPPH• (2,2 DiPhényle-1-Picryl-Hydrazyle (Marc *et al.*, 2004)

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation:



Où: (AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényl picryl hydrazine (jaune) (Figure 05) (Brand-William *et al.*, 1995).

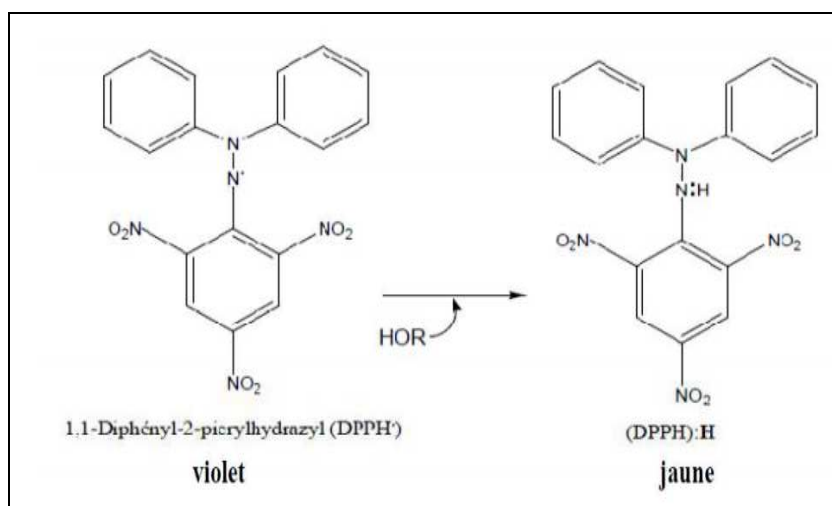


Figure 05. Piégeage du radical libre DPPH (Parejo *et al.*, 2002)

b. Mode opératoire

La capacité des huiles essentielles de la plante à piéger le radical libre DPPH est évaluée en utilisant la méthode décrite par Lai *et al.*, (2009), suivi du calcul de l'IC₅₀ et de l'indice de l'activité antioxydante (AAI) (Scherer et Godoy, 2009).

On prépare les solutions mères des huiles essentielles dans l'éthanol à une concentration de 15 mg/ml. 1,5 ml de chaque solution sont mélangés avec 0,5 ml d'une solution éthanolique de DPPH (0,1mM).

En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 1,5ml d'éthanol avec 0,5 ml d'une solution éthanolique de DPPH.

Une expérience de contrôle positif a été effectuée en utilisant le BHT dont les concentrations varient entre 1 et 60 µg/ml.

Les mélanges réactionnels sont agités vigoureusement et incubé 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Les absorbances sont mesurées à 517 nm.

L'expérience est réalisée en triplicata.

c. Expression des résultats

➤ Calcul de pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition (PI %) du radical libre DPPH a été calculé avec la formule suivante (Leitao et al., 2002 ; Wang et al., 2002) :

$$\text{PI \%} = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

Où :

PI : Pourcentage d'inhibition exprimé en %.

A₀: Absorbance de la solution du DPPH' sans échantillon (contrôle négatif).

A : Absorbance de la solution du DPPH' en présence de l'échantillon.

➤ Calcul de concentration inhibitrice IC₅₀

La concentration inhibitrice (IC₅₀) est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire et neutraliser 50% du radical DPPH (Bouhaddouda, 2016) (autrement appelée concentration effective (EC₅₀) correspondant à 50 % d'inhibition et qui constitue l'activité antioxydante des HES) (Mansouri et al., 2011).

L'IC₅₀ utilisée comme une estimation de l'activité antioxydante par DPPH, est estimée par extrapolation en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition (PI %) en fonction de différente concentration (C) des HES. Cette valeur est comparée à celle trouvée pour le composé de référence (BHT) (Mansouri et al., 2011).

Les valeurs d'IC₅₀ ont été reportées en tant que moyenne plus ou moins l'erreur standard (SD). Une faible valeur d'IC₅₀ indique une forte capacité de l'extrait à agir comme piègeur du DPPH (Bouhaddouda, 2016).

➤ L'indice de l'activité antioxydante

L'indice de l'activité antioxydante (AAI) est calculé selon l'équation suivante (Bouhaddouda, 2016):

$$\text{AAI} = \text{concentration finale de DPPH } (\mu\text{g/ml}) / \text{IC}_{50} (\mu\text{g/ml}).$$

Les résultats d'AAI sont exprimés comme suit:

AAI < 0.5 → faible activité antioxydante.

1 > AAI > 0.5 → activité antioxydante modérée.

2 > AAI > 1 → forte activité antioxydante.

AAI > 2 → très forte activité antioxydante.

II.2.4.2. Activité antimicrobienne

II.2.4.2.1. Activité antifongique

a. Principe

Les huiles essentielles à tester sont incorporées à des concentrations variables dans le milieu de culture gélosé. Après solidification, le milieu estensemencé et incubé. Les résultats donnent la CMI qui est définie comme étant la plus faible concentration pour laquelle nous n'observons pas de croissance à l'œil nu (**Tantaoui et al., 1992 ; Fandohan, 2004**).

b. Protocole expérimental

■ Préparation des milieux de cultures contenant différentes concentrations des huiles essentielles

Compte tenu de la non miscibilité des huiles à l'eau et par conséquence au milieu de culture, une mise en émulsion de ces huiles a été réalisée par le tween 20 afin d'obtenir dans le milieu une répartition homogène des composés à l'état dispersé (**Remmal et al., 1993 ; Satrani et al., 2001**). Les milieux de différentes concentrations de 0,1% - 0,25% et 0,75% en huiles essentielles avec le tween 20, sont incorporées dans le milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) après autoclavage à 121° C, 1 bar pendant 30 min. Ces concentrations sont préparées de la façon suivante :

- ✓ Milieu 1(Témoin): 100 ml PDA+ 0.5ml tween.
- ✓ Milieu 2: 100 ml PDA + 100µl HES + 0,5ml tween 20.
- ✓ Milieu 3: 100 ml PDA + 250µl HES + 0,5ml tween 20.
- ✓ Milieu 4: 100 ml PDA + 750µl HES+ 0,5ml tween 20.

■ Ensemencement et incubation des boîtes de pétri

Le mélange de chaque milieu, est coulé à raison de 5,5 ml dans des boîtes de Pétri de 60mm de diamètre. A l'aide d'un embout stérile, nous découpons un fragment de culture

fongique d'environ 6 mm de diamètre à partir d'un tapis mycélien âgée de 7 jour, est déposé au centre de la boîte de pétri. Nous opérons de la même façon pour chaque champignons et chaque concentration d'huile essentielle, les boîtes de pétri sont ensuite fermées hermétiquement par le para film et incubées à 25°C, pendant 7 jours. Pour chaque concentration, trois répétitions sont préparées de la même façon, afin de minimiser l'erreur

▪ Expression des résultats

a. Taux d'inhibition (TI%)

D'après (**Doumbouya *et al.*, 2012**) les taux d'inhibition de la croissance par rapport au témoin, sont ensuite calculés selon la formule suivante :

$$TI(\%) = 100 \times (dC - dE) / dC$$

TI(%) = Taux d'inhibition exprimé en pourcentage.

dC = Diamètre de colonies dans les boîtes – ddi (mm).

dE = Diamètre de colonies dans les boîtes contenant les HES de plante

ddi = Diamètre de disc initiale (6 mm).

b. Détermination des concentrations inhibitrices (CMI)

La CMI correspond à la plus faible concentration en huiles essentielles pour laquelle on n'observe pas de pousse visible à l'œil nu sur le milieu solide (**Ouräini *et al.*, 2005**). Elle mesure donc, un effet fongistatique et ne renseigne pas sur l'état de la population du champignon, ne permettant notamment pas de préciser si elle a été tuée en partie ou totalement ou si elle a seulement cessé se multiplier (Bérézin et Brograd, 1999). Les boîtes de Pétri dont les concentrations ayant montré une absence totale de la croissance mycélienne; ont été sélectionnées pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI). (**Bessedik Khenfer**)

II.2.4.2.2. Activité antibactérienne

a. Principe

La technique utilisée est celle de la diffusion sur disque en milieu gélosé ou encore méthode des disques (**Dayal et Purohit, 1971**). C'est une méthode d'évaluation qualitative *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles.

Le principe de cette méthode est toujours la migration de l'huile essentielle par diffusion dans la gélose. Cette technique inspirée de celle des antibiogrammes, est généralisée aux huiles essentielles (**Tharib et al., 1983**).

Pour obtenir des résultats fiables, il faut travailler dans des conditions standardisées car plusieurs facteurs peuvent influencer les résultats: la densité de l'inoculum, la température, le temps d'incubation, la concentration du produit à tester, la composition du milieu de culture ainsi que l'épaisseur de la gélose (**Guerin-Fauble et Carret, 1999**).

b. Mode opératoire

La méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé est utilisée pour la détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles selon la méthode décrite par **Gulluce et al., (2007)**.

▪ Préparation de l'inoculum

Les espèces cibles (souches bactériennes choisies) ont été revivifiées et repiquées dans la gélose nutritive, puis incubées à des températures optimales de développements (37C°) pendant 18 heures pour l'obtention d'une culture jeune. Par la suite, des suspensions troubles de ces souches seront réalisées en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées et identiques. On les dépose dans 5 ml d'eau physiologique stérile puis on agite au vortex. Les concentrations bactériennes de l'inoculum sont évaluées par turbidité et sont exprimées par la mesure de la densité optique (DO à 600 nm) sur un spectrophotomètre. Une DO de 0.08 à 0.1 correspond à une concentration de 10⁸UFC/ml (**Sarac et al., 2007; Athamena et al., 2010 ; Karatas et al., 2010**).

▪ Ensemencement

Dans des boîtes de Pétri, le milieu de culture gélosé MH en surfusion est coulé aseptiquement à raison de 15 ml par boîte. Après la solidification, un écouvillon stérile imbibé avec la suspension bactérienne fraîchement préparée est étalé à la surface de la gélose à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose dans le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum. On laisse sécher les boîtes pendant 15 à 20 min.

▪ Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet des huiles essentielles. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'huile essentielle.

Trois antibiotiques différents ont été utilisés ; Amoxicilline 25 μ g, Ofloxacin 5 μ g (Of1), Chloramphénicol 30 μ g.

▪ **Test de sensibilité aux huiles essentielles : Aromatogramme**

La solution mère est préparée par solubilisation des HES brute dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO) à 10%, pour atteindre une concentration initiale de 100 mg/ml.

A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre stérilisés de 6 mm de diamètre (Whatman n°1), stérile sont déposés à la surface de la gélose ensemencée à raison de quatre disques par boîte. Chaque disque est ensuite imprégné d'une quantité de 10 μ l des huiles essentielles de différentes concentrations. Des disques de papier filtre stérilisés de 6 mm de diamètre (Whatman n°1), imprégnés de 10 μ l de DMSO sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince bactériologique stérile. Le DMSO est utilisé comme contrôle négatif.

▪ **Incubation**

Toutes les boîtes de Pétri sont scellées avec du parafilm stérile afin d'éviter l'évaporation éventuelle des HES. Elles sont maintenues à 4 °C pendant 2 heures, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures.

▪ **Expression des résultats**

Les résultats des aromatogrammes sont exprimés exclusivement à partir de la mesure du diamètre des halos d'inhibitions, en millimètre et enregistrée en tant que moyenne \pm Erreur standard. Tous les tests sont effectués en triplicata.

Cette mesure est souvent transcrite dans différents symboles proportionnels à l'activité antimicrobienne (Tableau II).

Tableau II. Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition pour des disques imprégnés de 10 µl d'huile essentielle (Belaiche, 1979).

INHIBITION* mm	TRANSCRIPTION	SENSIBILITE
0	0	Résistant
<5	±	Peu sensible
>10	+	Sensible
20 à 30	++	Assez sensible
□ 30	+++	Très sensible

* valeur du diamètre du disque imbibé soustraite

II.3. Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne. L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel Graph pad Prism. Les différences ont été considérées statistiquement significatives pour $p < 0,05$ dans l'ensemble des analyses statistiques en utilisant l'analyse de la covariance « One way » le test de Tukey et de Dunnett.

Chapitre 03

Résultats et Discussion

III.1. L'extraction des HES

Le rendement, est déterminé par rapport à 100 g de matériel végétal sec et broyé, est exprimé en pourcentage (Tableau III).

Tableau III. Rendement en HES de *M. pulegium* L.

Matériel végétal	essai	Rendement %	
<i>Mentha pulegium</i> L.	1	0.63	0.64 ± 0.01%
	2	0.66	
	3	0.64	

L'extraction des huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. a donné un rendement de 0.64 ± 0.01%. Ce résultat n'est pas loin à celui reporté par **Zwaving et Smith (1971)** qui ont obtenus un rendement de 0.95% en Grèce. **Kokkini et al., (2004)** ont étudié la menthe pouliot de plusieurs régions de Grèce dont les rendements en huiles essentielles varient entre 1.0% et 3.8%. *M. pulegium* L. du maroc étudiée par **Benayad (2008)**, **Derwich et al., (2010)** et **Ait-Ouazzou et al., (2012)** a révélée des teneurs en huile essentielle nettement supérieurs au résultats obtenu dans notre étude évalué à 2.33%, 1.66% et 2.7% respectivement. Cependant **Zekri et al., (2013)** ont déterminé des rendements obtenus jusqu'à 5.29% à 6.2% pour la menthe pouliot du Maroc. En Algerie, **Beghidja et al (2007)** et **Benabdallah (2008)** ont déterminé les rendements en huile essentielle de la menthe pouliot récoltée dans plusieurs régions de Jijel ainsi que la région d'El Kala. Les valeurs obtenues étaient de 1.16 à 2.19% et 1.45%, respectivement.

Ces variations de teneurs en huiles essentielles *M. pulegium* L. peuvent être attribuées à différents facteurs environnementaux prenant en compte que l'huile essentielle est un produit métabolique de cellules végétales et sa composition quantitative et qualitative peut être influencée par les conditions climatiques (notamment le type de climat, l'altitude, le taux d'exposition au soleil) le type de sol, le stade de croissance de la plante en question, le moment de la récolte et la méthode d'extraction (**Besombes, 2008 ; Béjaoui et al., 2013**).

III.2. Le taux d'humidité

La détermination de l'humidité de matière sèche de *Mentha pulegium* L. a révélé un taux nettement supérieure à la moitié du poids de matière fraîche. Ce taux correspond à environ 81.04% (Figure 6). Ce qui signifie que 18.96% seulement représente le taux de matière sèche ayant servi à l'extraction des huiles essentielles.

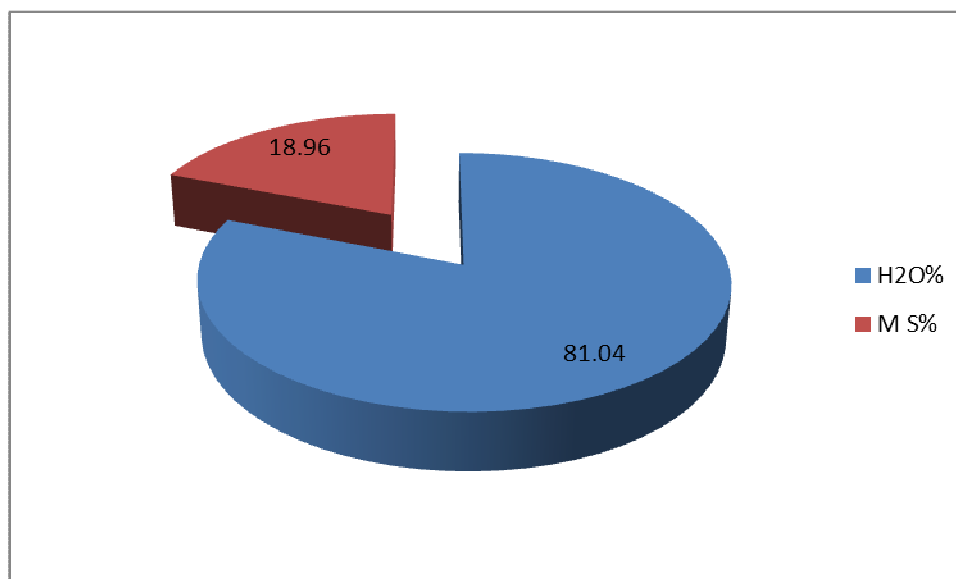


Figure 6. Taux d'humidité et de la matière sèche du *Mentha pulegium* L.

III.3. Caractères organoleptiques

Les caractères organoleptiques des huiles essentielle de *M. pulegium* L. obtenue par l'hydrodistillation sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV. Caractères organoleptiques des HES.

Plante	Caractères organoleptiques		
	Aspect	Couleur	Odeur
<i>M. pulegium</i> L.	Liquide Limpide	Jaune pale	Dégage une forte odeur menthée caractéristique

III.4. Activités biologiques

III.4.1. Activité antioxydante

III.4.1.1. Le teste de DPPH

Le DPPH est un radical libre permettre de déterminer le potentiel de piégeage des huiles essentielles grâce à sa sensibilité à détecter les composants actifs à des basses concentrations (Yi *et al.*, 2008).

L'activité antioxydante des huiles essentielles de *M. pulegium* L. est évaluée par le test de piégeage du radical DPPH. Il est bien connu que quand une solution de DPPH est mélangée avec celle d'une substance contenant des antioxydants, le radical libre stable DPPH (couleur violet foncé) est converti en 1,1-diphényl-2-picryle hydrazine ce qui entraîne une décoloration facilement mesurable à 517 nm (Molyneux, 2004).

L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. et du témoin BHT (antioxydant de référence).

L'activité antioxydante des HES est exprimée en IC₅₀ et en AAI, ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (Abdulmajed *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2012; Ranga *et al.*, 2009), il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. Plus la valeur d'IC₅₀ est petite, plus l'activité de l'échantillon testé est grande.

La cinétique du pourcentage d'activité antiradicalaire (régression linéaire) nous a permis de déterminer l'IC₅₀, qui correspond à la concentration d'huile essentielle, ou de BHT nécessaire à l'inhibition de 50% du DPPH présent dans le milieu.

Les figures 7 et 8 illustrent l'efficacité des huiles essentielles et du BHT à piéger le radical DPPH, traduite par le taux d'inhibition (I%) en fonction des différentes concentrations. D'après les résultats, l'évolution de l'activité antiradicalaire est dose-dépendante, car elle augmente avec l'augmentation des concentrations.

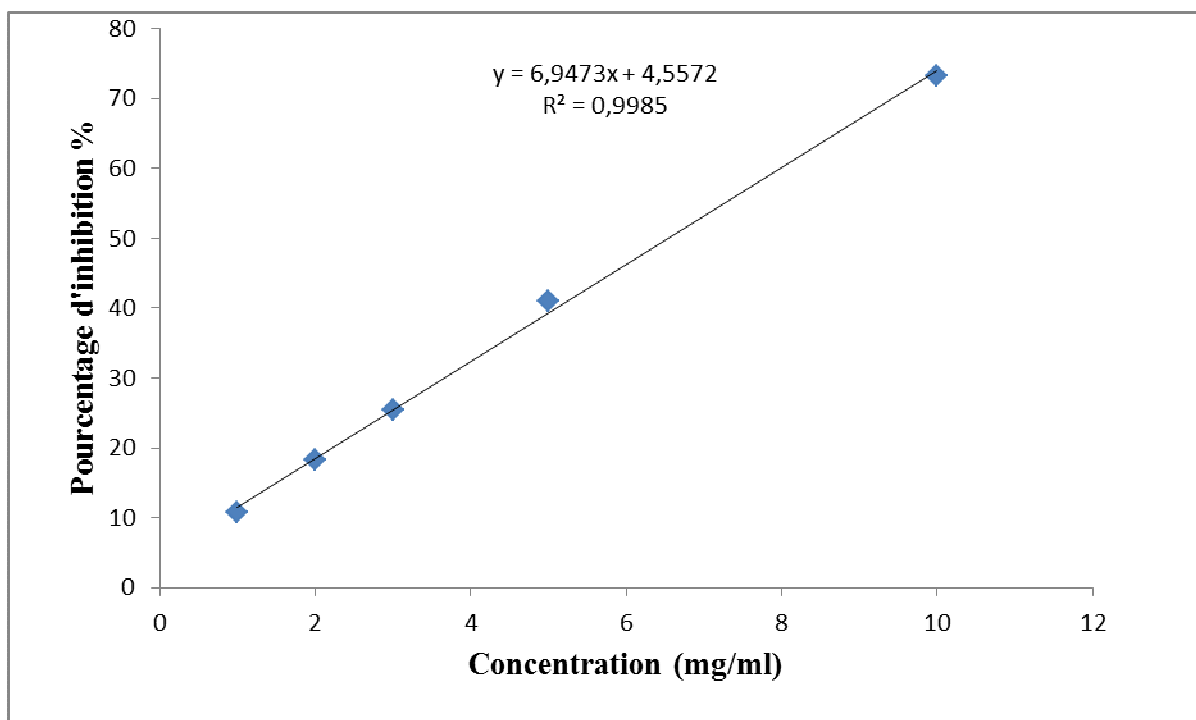


Figure 07. Activité anti-radicalaire des HES de *M. pulegium* L.

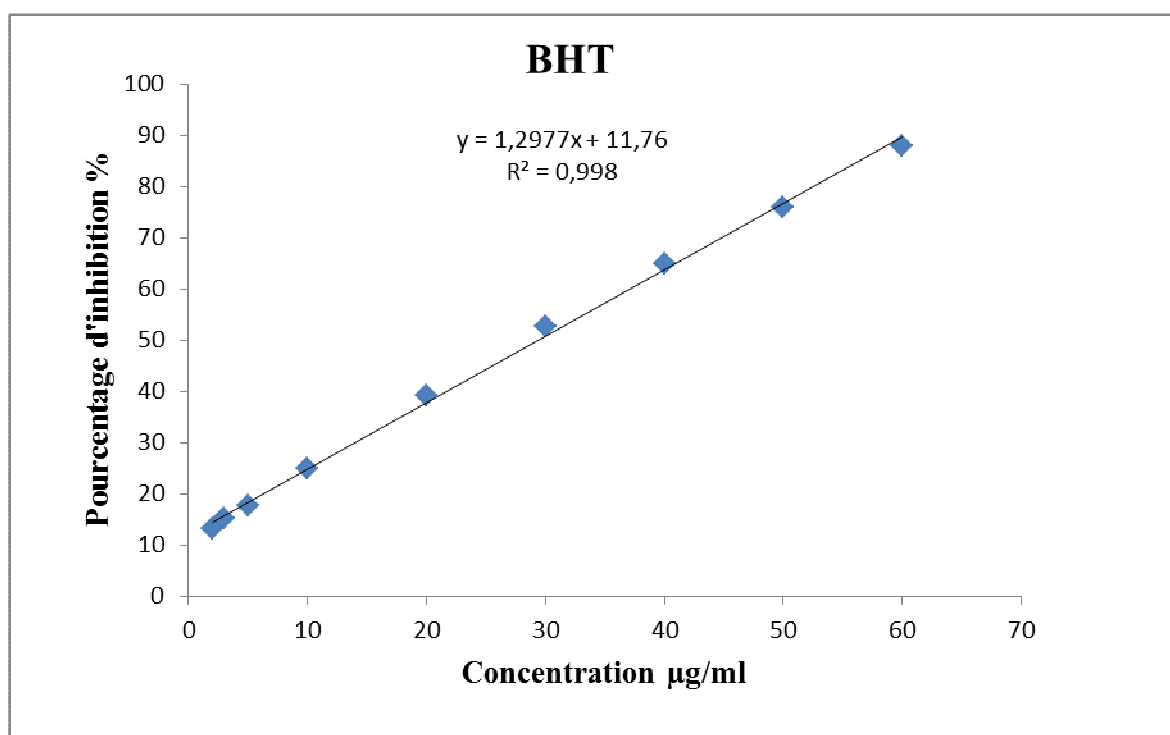


Figure 8. Activité anti-radicalaire du standard BHT.

Les résultats des propriétés antioxydantes des huiles essentielles de la plante étudiée et le BHT sont présentés dans le tableau V. L'activité est exprimée sous la forme de valeurs d'IC₅₀ et d'AAI.

Tableau V. Activité antioxydante des huiles essentielles de *M. pulegium* L.

Antioxydants	IC ₅₀ (µg/ml)	AAI
HES de <i>M. pulegium</i> L.	6700 ± 0.28	0,006
BHT	29.62 ± 0.13	1,35

Les valeurs des IC₅₀ pour les HES de *M. pulegium* L., ainsi que pour le BHT sont présentées dans la figure 09.

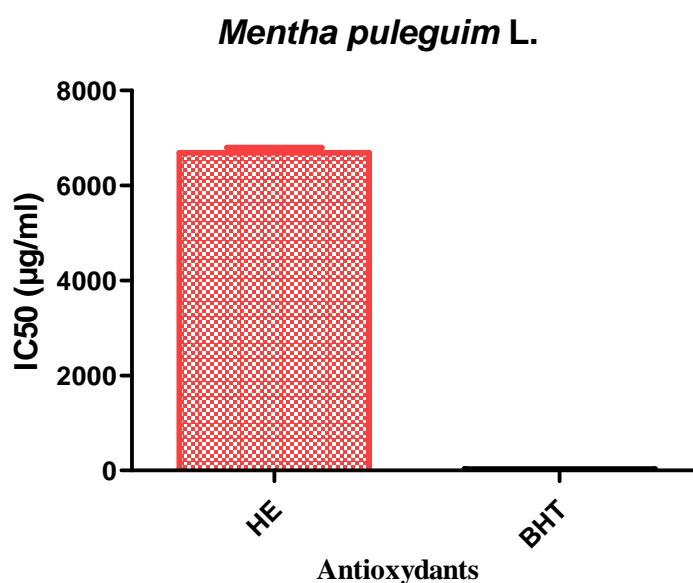


Figure 09. IC₅₀ en µg/ml dl'HE *L. steochas* L. et de standard (BHT).

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3).

Les huiles essentielle de *M. pulegium* L a montré une activité antioxydante sur le radical DPPH avec une (IC₅₀ = 6700 ± 0.28 µg/ml) et un AAI (indice de l'activité antioxydante) de 0.005, supérieur de celui de *M. pulegium* L. d'Iran qui s'est avéré posséder une faible capacité antioxydante (IC₅₀ = 14736 µg/ml et AAI = 0.003) (**Kamkar et al., 2010**). Cependant, la capacité antioxydante de ces huiles essentielle reste modérée par rapport

à l'antioxydant synthétique de référence, BHT ($IC_{50} = 29 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ et $AAI = 1.35$) ($P < 0.0001$).

L'activité antioxydante des huiles essentielles de *M. pulegium* étudiée, peut être attribuée à sa composition chimique (**Ruberto et Baratta, 2000**).

Le composé majoritaire de cette huile, le pulégone (61.11%), s'est révélé être un bon antioxydant (**Ruberto et Baratta, 2000**), ceci peut donc expliquer le fort pouvoir antioxydant de cette huile essentielle contrairement à la nôtre où nous avons noté probablement l'absence du pulégone.

Les résultats obtenues sont comparées avec des études antérieures qui rapportés une grande variation dans l'activité antioxydante des HES de *M. pulegium*. **Hajlaoui et al., (2009)** ont rapporté une forte capacité antioxydante de l'huile essentielle ($IC_{50} = 10 \mu\text{g/ml}$).

Ces divergences dans la propriété antioxydante de la menthe pouliot peuvent être dues à sa composition. À cet égard, **Duh (1999)** a pu déterminer que la présence et la synergie des différents antioxydants, présents dans une huile essentielle spécifique, détermineront leurs propriétés antioxydantes. L'inévitable l'activité antioxydante modéré des huiles essentielles de *M. pulegium* L. étudiée, peut être attribuée à sa composition chimique et en particulier à l'absence de pulégone (un fort antioxydant) et à l'abondance de pipéritone qui ne possède pas un bon pouvoir antioxydant (**Ruberto et Baratta, 2000**).

III.4.2. Activité antimicrobienne

III.4.2.1. Activité antibactérienne

Le pouvoir antibactérien des HES de *M. pulegium* L. a été étudié *in vitro* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide, (Mueller-Hinton).

L'activité antibactérienne des HES et des antibiotiques a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant cette huile à tester vis-à-vis de cinq (5) germes pathogènes; deux de Gram + (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) et trois de Gram - (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Micrococcus luteus*). Chaque halo, une zone claire, montre la destruction des germes pathogènes et donne une indication précise de l'activité antibactérienne des HES et des antibiotiques utilisés.

III.4.2.1. Antibiogramme

Trois antibiotiques (GM 10 µg, CHL 30 µg et OFL 5 µg) ont été testé par la méthode standard des disques. Les mesures des zones d'inhibition figurant dans le tableau VI ont permis de classer les souches selon les antibiotiques. La plupart des souches testées ont montré des sensibilités différentes aux antibiotiques standards testés.

Les résultats des tests des antibiogrammes sont obtenus comme suit :

Pour l'antibiotique (ATB) GM les souches bactériennes, l'*E. coli* ; *B. subtilis* et *P. aeruginosa*, sont assez sensibles avec des zones d'inhibition de $21,00 \pm 1,00$ mm ; $20,00 \pm 1,00$ mm et $24,33 \pm 0,58$ mm respectivement et sont sensibles avec des zones d'inhibition de $18,67 \pm 0,57$ mm pour *S. aureus* et $19,50 \pm 0,5$ mm pour *M. luteus*.

Pour le CHL les deux bactéries l'*E. coli* et *B. subtilis* sont très sensibles avec des zones d'inhibition de $30,33 \pm 0,57$ mm et $30,33 \pm 0,58$ mm respectivement et assez sensible avec des zones d'inhibition de $21,33 \pm 1,15$ mm pour *S. aureus* ; $25,33 \pm 0,58$ mm pour *P. aeruginosa* et *M. luteus* de $23,33 \pm 1,15$ mm.

Finalement, Tous les souches bactériennes étudiées (*E. coli* ; *S. aureus* ; *B. subtilis* ; *P. aeruginosa* et *M. luteus*) sont tous assez sensibles à l'ATB OFL avec des zones d'inhibition de $21,00 \pm 1$ mm ; $20,67 \pm 1,15$ mm ; $20,00$ mm ; $21,00 \pm 1$ mm ; $27,50 \pm 0,5$ mm respectivement. Une différence est statistiquement significative à $P < 0.05$.

Tableau VI. Diamètre des zones d'inhibition de la croissance microbienne par les antibiotiques exprimée en mm (moyenne \pm SD), transcrite en sensibilité.

Souches/ /Test		Antibiotiques			
		Antibiotiques utilisés	Diamètres d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité
Gram+	<i>S. aureus</i>	GM 10 μ g	18.67 \pm 0.57	+	Sensible
		CHL 30 μ g	21.33 \pm 1.154	++	Assez sensible
		OFL 5 μ g	20.67 \pm 1.154	++	Assez sensible
	<i>B. subtilis</i>	GM 10 μ g	20 \pm 1	++	Assez sensible
		CHL 30 μ g	30.33 \pm 0.58	+++	Très sensible
		OFL 5 μ g	20 \pm 0	++	Assez sensible
Gram-	<i>P. aeruginosa</i>	GM 10 μ g	24.33 \pm 0.58	++	Assez sensible
		CHL 30 μ g	25.33 \pm 0.58	++	Assez sensible
		OFL 5 μ g	21 \pm 1	++	Assez sensible
	<i>E. coli</i>	GM 10 μ g	21 \pm 1	++	Assez sensible
		CHL 30 μ g	30.33 \pm 0.57	+++	très sensible
		OFL 5 μ g	21 \pm 1	++	Assez sensible
	<i>M. luteus</i>	GM 10 μ g	19.50 \pm 0.5	+	Sensible
		CHL 30 μ g	23.33 \pm 1.154	++	Assez sensible
		OFL 5 μ g	27.50 \pm 0.5	++	Assez sensible

III.4.2.2. Aromatogramme

Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes face aux huiles essentielles varient de 9mm à 15 mm pour la première concentration (c= 50mg/ml), et de 11mm à 17 mm pour la deuxième concentration (C= 100mg/ml) (Tab VII).

Pour les deux concentrations, *E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sont les plus sensibles aux HES, elles atteintes 15 ± 1 , 17 ± 1.73 mm et 13.67 ± 0.58 , 17.33 ± 1.15 mm respectivement.

Bacillus subtilis, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus* sont moins sensibles, (11.17 ± 1.26 , 16.83 ± 0.76), (11 ± 1 , 15.33 ± 0.58), (9 ± 1 , 11.67 ± 0.58) mm respectivement.

Tableau VII. Diamètre des zones d'inhibition de la croissance microbienne par les HES exprimée en mm (moyenne \pm SD), transcrite en sensibilité.

Souches/ /Test		Huile Essentielle 100 mg/ml			Huile Essentielle 50 mg/ml		
		Diamètres d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité	Diamètres d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité
Gram+	<i>S. aureus</i>	11.67 \pm 0.58	+	Sensible	9 \pm 1	+	Sensible
	<i>B. subtilis</i>	16 \pm 0,76	+	sensible	11.17 \pm 1,26	+	sensible
Gram-	<i>P. aeruginosa</i>	17,33 \pm 1,15	+	sensible	13,67 \pm 0,58	+	sensible
	<i>E. coli</i>	17 \pm 1.73	+	sensible	15 \pm 1	+	sensible
	<i>M. luteus</i>	15.33 \pm 0,58	+	sensible	11 \pm 1	+	sensible

(-) résistance, (+) sensible, (++) assez sensible, (+++) très sensible.

Les valeurs obtenues à partir de la méthode de diffusion sur disque, indiquent que les huiles essentielles restent efficaces dans l'inhibition de développement bactérienne avec des zones d'inhibition proches à celle des antibiotiques. Tandis que le DMSO n'a aucune activité antibactérienne dont les zones d'inhibition sont totalement absentes (Figure 10).

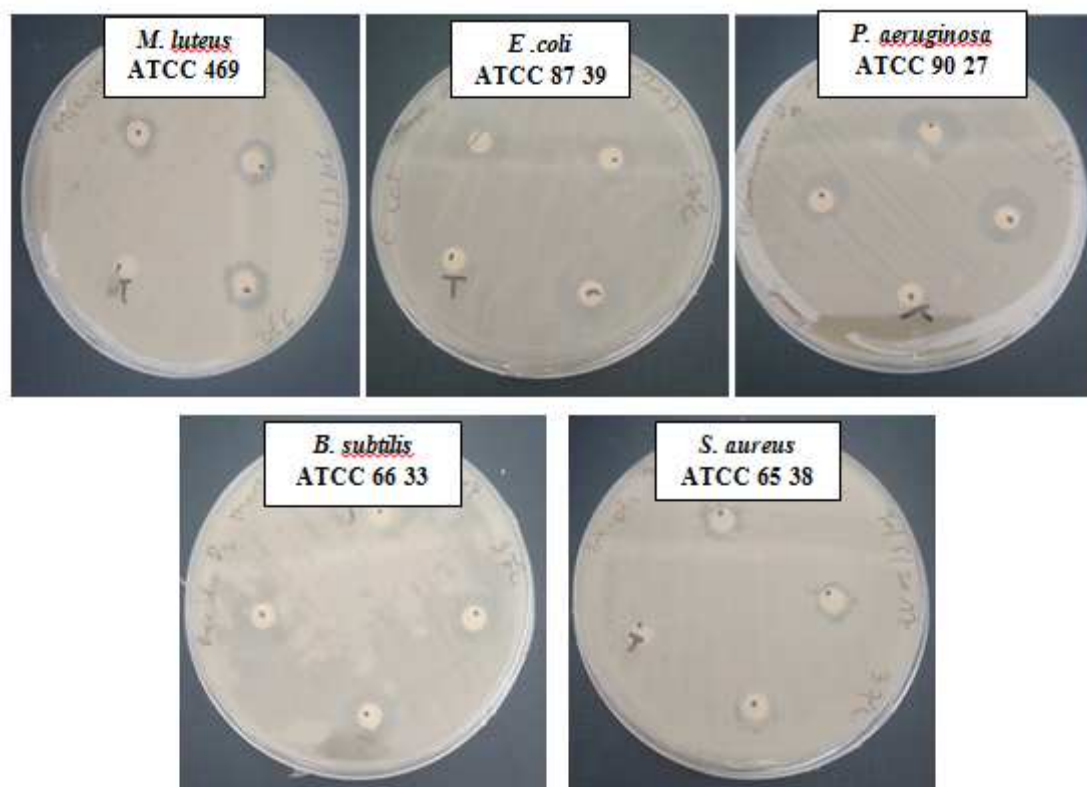


Figure 10 : l'effet antimicrobien des huiles essentielles de *M. pulegium* L. (Originale, 2017).

Ces résultats sont en accord avec les précédents rapports sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la menthe pouliot ; **Benabdallah (2008)** décrit des diamètres d'inhibition de l'huile essentielle de la menthe pouliot algérienne entre 10 et 22 mm, dont le diamètre le plus important concernait *E. coli*. Cependant, l'activité antibactérienne des huiles essentielles riche en pulégone a été rapportée. **Hajlaoui et al. (2009)** ont montré que l'huile essentielle de *M. pulegium* de Tunisie présentait une grande activité antibactérienne avec des diamètres d'inhibition de 10 à 31 mm plus élevées que nos résultats.

D'après **Ait-Ouazzou et al. (2012)**, l'huile essentielle générant des diamètres d'inhibition de 12.6 ± 0.5 mm contre une gamme de bactéries, alors que *Pseudomonas aeruginosa* y était résistante.

A propos de **Mahboubi et Haghi (2008)** ont noté une bonne activité antibactérienne avec des diamètres d'inhibition et des valeurs de l'ordre de 8-21 mm pour les HES de *M. pulegium* L. d'Iran à chémotype pipéritone/pipéritenone, cependant cette huile n'a présenté aucune activité sur *Escherichia coli*.

En ce qui concerne l'activité antibactérienne, elle peut être attribuée à la teneur élevée de l'huile essentielle en un composé oxygéné : le pipéritone. En effet, cette activité concerne toujours les composés majoritaires de l'huile essentielle, impliquant soit une concentration élevée de pipéritone et les effets synergiques des autres constituants (**Mahboubi et Haghi, 2008**), soit une teneur élevée en pulégone (**Hajlaoui et al., 2009**). Quel que soit le cas, en général, les monoterpènes oxygénés, qui sont nettement plus actifs que les monoterpènes hydrocarbonés (**Carson et Riley, 1995**) sont généralement présents à des concentrations significatives dans les huiles essentielles de *M. pulegium* L.

Selon les résultats obtenus, il est possible de conclure que l'huile essentielle de *M. pulegium* a un grand spectre d'activité antibactérienne.

Il est connu dans la littérature que les bactéries Gram-positif sont plus sensibles aux huiles essentielles et extraits végétaux que les bactéries Gram-négatif (**Karaman et al., 2003 ; Şahin et al., 2002**). ceci est dû aux différences structurales de leurs membranes externes (**Inouye et al., 2001 ; Lopez et al., 2005 ; Bozin et al., 2006**). Ces composants chimiques exercent leur activité antimicrobienne sur les micro-organismes par la perturbation de l'intégrité membranaire. (**Knobloch et al., 1989**). la pénétration des composés actifs présents dans les HES est donc différente (**Kheyer et al., 2014**). Chez les bactéries Gram- , la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace, riche en lipopolysaccharide dont les charges négatives de surface empêchent la diffusion des molécules hydrophobes (**Nikaido et al., 2003**), toutefois, quelques composés phénoliques de faible poids moléculaire peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires à l'aide de leurs groupes fonctionnels et se faufiler jusqu'à la membrane intérieure plus vulnérable (**Dorman et al., 2000**). Autrement dit, les composés hydrophobes sont capables de perturber la membrane plasmique et la membrane externe des bactéries Gram- en induisant sa perméabilité et la mort cellulaire (**Wang et al., 2012**). Les bactéries Gram positif sont moins protégées contre les agents antibactériens, vu que le peptidoglycane n'entrave que la diffusion des molécules supérieures à plus de 50 kDa (**Nikaido et Vaara, 1985; Hogan et Kolter, 2002**).

III.4.2.2. Activité antifongique

Dans le domaine phytosanitaire et agroalimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire.

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des Labiatae : thym, origan, lavande, menthe, ...etc. étant donnée la grande complexité de la composition chimiotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (Abadlia et chebbour, 2013).

L'activité antifongique des huiles essentielles étudiées a été déterminée par la méthode de contact directe, basée sur l'inhibition de la croissance mycélienne de disques de champignons déposés au centre des milieux gélosés additionnés de différentes concentrations en huiles essentielles (0,1% - 0,25% et 0,75%). Les résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle vis-à-vis trois souches (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Fusarium moniliform*) sont présentés dans la figure 11 et 12.

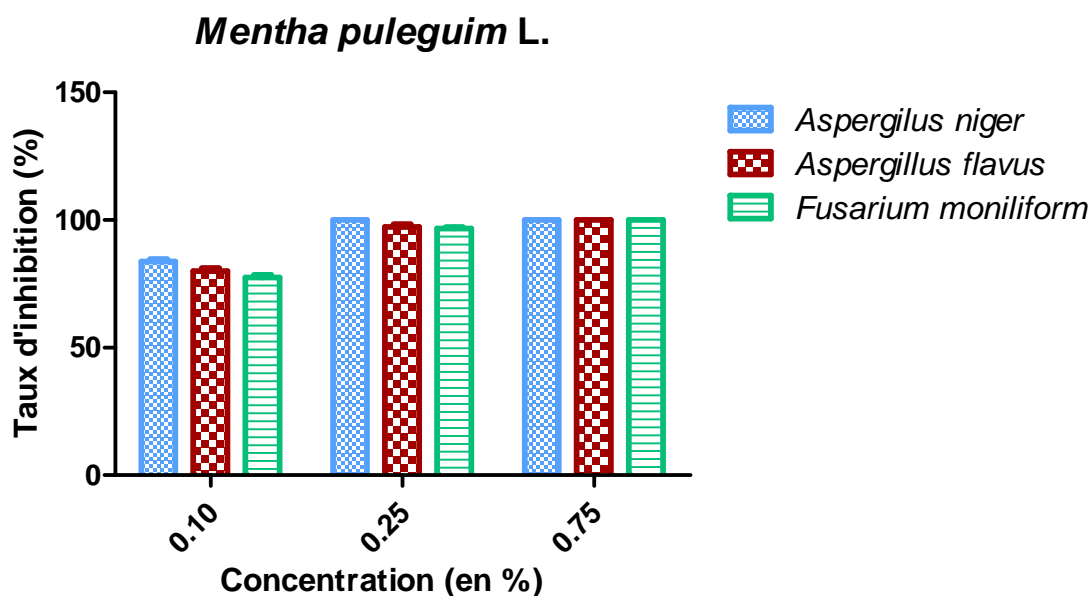


Figure 11. Effet des huiles essentielles de *M. puleguim* L., sur les souches testées.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

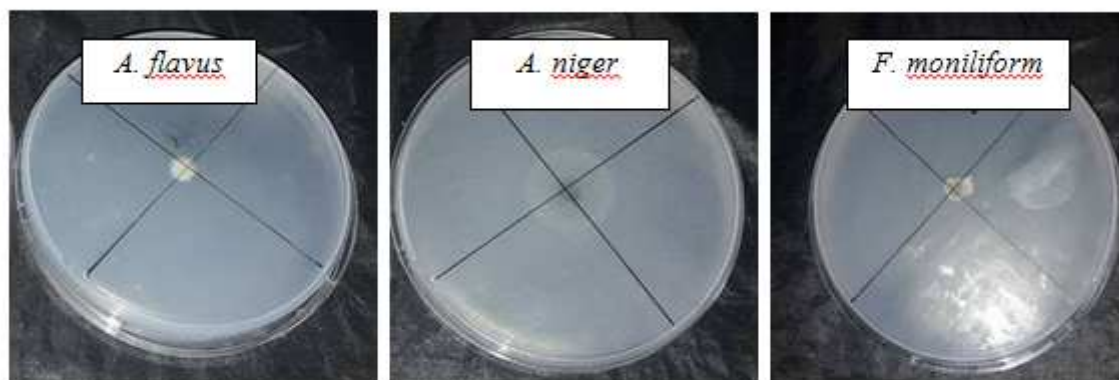


Figure 12. L'effet antifongique des huiles essentielles de *M. pulegium* L. (Originale, 2017).

On remarque que les trois souches fongiques étaient sensibles aux HES. La réduction de la croissance mycélienne est observée par toutes les concentrations testées et l'augmentation de la dose en huile essentielle est accompagnée d'une meilleure efficacité. Cependant, il y avait de différence significative dans l'inhibition mycélienne entre les trois concentrations (0,10%, 0,25% et 0,75%) dont ($P < 0.05$).

Aspergillus niger est la souche la plus sensible aux HES de *M. pulegium*. Elle atteint 100% d'inhibition mycélienne dans la concentration de 0,25%.

A partir des résultats enregistrés dans les figures 11 et 12, on trouve que la concentration minimale inhibitrice CMI des huiles de *M. pulegium* L. est 0,25% pour *A. niger* et de 0,75% pour *A. flavus* et *F. moniliform*.

L'huile essentielle de *M. pulegium* a été étudiée par **Mahboubi et Haghi (2008)**, et son activité sur *Aspergillus niger* a montré un faible pouvoir antifongique avec une CMI égale à 8 $\mu\text{l/ml}$

L'activité antifongique est due probablement au type et à la structure moléculaire des composants actifs présents dans les HES, tels que les terpènes qui affectent non seulement la perméabilité mais aussi d'autres fonctions dans les membranes cellulaires (**Omidbeygi et al., 2007 ; Cristani et al., 2007**).

Cependant, de tous les effets possibles des monoterpènes sur les membranes biologiques, les effets délétères sur les membranes mitochondriales devraient provoquer une inhibition du métabolisme énergétique mitochondrial, ce qui entraîne des perturbations dans

un large éventail des processus physiologiques et biochimiques dans la cellule (Yoshimura et al., 2010).

L'activité antifongique des huiles essentielles, peut être expliquée par l'effet synergique entre leurs différents composés. En effet, les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antifongique de ces huiles essentielles (Giordani et al., 2008).

Les travaux de Chebli et al., (2003) et de Vilela et al., (2009) ont montré que la pulégone et le 1,8-cinéole purs provoquent une inhibition de la croissance mycélienne, mais à des concentrations plus élevées que les huiles essentielles dans leur totalité ; ainsi l'activité de l'huile essentielle est le résultat de ses composés majoritaires et aussi de l'effet synergique des composés minoritaires (Chebli et al., 2003 ; Ouraini et al., 2007).

Nos résultats corroborent d'autres travaux sur le pouvoir antifongique des huiles essentielles de la menthe pouliot. En effet l'équipe de Lahlou (2005) a montré que l'huile essentielle de *M. pulegium* L. inhibe la croissance d'un *Penicillium sp.* à un volume de 20 µl. Ouraini et al., (2005), Ouraini et al., (2007) ont obtenu une inhibition totale de la croissance des dermatophytes à partir d'une concentration de 2 µg/ml de l'huile essentielle de *M. pulegium* L. Par ailleurs, *Botrytis cinerea*, un autre champignon responsable de la pourriture des pommes, ainsi que d'autres espèces fongiques (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum* et *Trichoderma sp.*) sont tous sensibles à l'activité antifongique de l'huile essentielle de la menthe pouliot (Chebli et al., 2003 ; Hajlaoui et al., 2009).

L'huile essentielle de *M. pulegium* L. a été étudiée par Mahboubi et Haghi (2008), et son activité sur *Aspergillus niger* a montré un faible pouvoir antifongique avec une CMI égale à 8 µl/ml. Aussi, Hajlaoui et al., (2009) ont révélé que l'huile essentielle des feuilles de cette plante n'avait pas d'effet sur les différentes espèces fongiques testées à la concentration de 1 µl/ml. Même à 100 µl/ml le taux d'inhibition demeure inférieur à 100% (74-90.6).

On suppose que les huiles essentielles peuvent avoir une activité antimicrobienne en influençant des cibles bactériennes et fongiques impliquées dans le métabolisme cytoplasmique et membranaire. Plusieurs études ont montré que ce sont spécialement les monoterpènes qui sont impliqués dans cette activité. En effet, on a montré que le groupe hydroxyle est capables de former des liaisons hydrogènes avec les emplacements actifs de la membrane cytoplasmique de la cellule ciblée, modifiant ainsi les propriétés physiques et

chimiques de la membrane et affectant à la fois la structure lipidique et la stabilité de la bicouche, ce qui induit une augmentation de la fluidité et de la perméabilité membranaire et ainsi il y'a modification des processus de transport d'ions (**Reichling et al., 2006, Arfa et al., 2006 ; Derwich et al., 2010**).

Conclusion

Conclusion et perspectives

Conclusion

L'intérêt accordé à l'étude scientifique du pouvoir thérapeutique des plantes médicinales n'a cessé d'augmenter durant ces dernières années dans le but de rechercher des alternatives aux substances chimiques, qui présentent des risques pour la santé humaine et l'environnement. Dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer *in-vitro* l'activité antibactérienne, antifongique et antioxydante des HES extraites de la plante *Mentha pulegium* L. utilisée en médecine traditionnelle en Algérie

L'huile est extraite par la méthode d'hydrodistillation. Les analyses quantitatives de ces huiles a montré un rendement de $0.64 \pm 0.01\%$.

L'étude du pouvoir antioxydant de nos huiles par la méthode de piégeage du radical libre DPPH., démontre que les HES de la plante étudiée a une capacité antiradicalaire modéré ($IC_{50} = 6.7 \pm 0.28$ mg/ml) par rapport avec celle de l'antioxydant standard, BHT ($IC_{50} = 29 \pm 0.13$ mg/ml).

En ce qui concerne le pouvoir antibactérien par la méthode de diffusion de disque des HES de *Mentha pulegium* L, nos résultats montrent que les cinq souches bactériennes testées sont sensibles aux HES de *Mentha pulegium* L. On peut déduire que nos extraits ont un bon pouvoir antibactérien sur les souches bactériennes testées. Exprimé par des diamètres des zones d'inhibition entre 9 et 17 mm.

Par ailleurs, l'étude du pouvoir antifongique des HES étudiés vis-à-vis trois souches mycéliennes (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *fusarium monoliformum*) a été réalisé en appliquant la méthode de contact direct. Les résultats obtenus montrent que les HES ont une capacité inhibitrice de la croissance mycélienne des souches testées exprimé par un indice antifongique remarquable.

Ces résultats restent préliminaires et nécessitent des études complémentaires approfondies à différents niveaux de l'approche à travers une caractérisation fine et poussée de ces huiles essentielles par d'autre techniques telles que la CPG/SM ou l'HPLC/SM afin d'établir une relation structure-activité. Les activités antimicrobienne et antioxydante doivent être évaluées dans d'autres systèmes *in vitro* (cellulaires et enzymatiques) comme *in vivo* afin de mieux cerner les interactions moléculaires de ces huiles vis-à-vis de leurs cibles.

Conclusion et perspectives

Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'efficacité des extraits étudiés :

- l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans les HES en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de cette plante,
- Evaluer et tester les différentes molécules isolées *in vivo* sur différents modèles biologique en vue de les utiliser à des fins thérapeutiques et de conservation des produits destinés à la consommation.
- développer des produits à la base de plantes qui peut être un alternatif à l'utilisation des produits de synthèse pour lutter contre les agents pathogènes

*Références
Bibliographiques*

- Abdulmajed K., McGuigan C. and Heard C. M., 2005:** Topical delivery of retinyl ascorbate: 4. Comparative anti-oxidant activity towards DPPH. *Free Radic. Res.* 39: 491-498.
- AFNOR ., 2000:** Recueil de normes Francaises "Huiles essentielles", AFNOR, Paris. AFNOR NFT 75- 006. 2000.
- Agnihotri V.K., Agarwal S.G., Dhar P.L.,Thappa Baleshwar R.K., Kapahi B.K., Saxena R.K. & Qazi G.N., 2005 :** Essential oil composition of *Mentha pulegium L.* growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour Frag. J.* 20: 607–610. Diaz-Maroto M.C., Castillo N., Castro-Vazquez L., Gonzalez-Vinas M.A. & PerezCoello M.S., 2007. Volatile composition and olfactory profile of pennyroyal (*Mentha pulegium L.*) plants. *Flavour Frag. J.* 22: 114-118.
- Agnihotri VK., Agarwal SG., Dhar PL., Thappa RK., Kapahi BK., Saxena RK.et Qazi GN., 2005:** Essential oil composition of *Mentha pulegium L* growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour Fragr. J.* 20: 607-610.
- Ahmad N., Fazal H., Abbasi B. H., Anwar S. et Basir A., 2012:** DPPH free radical scavenging activity and phenotypic difference in hepatoprotective plant (*Silybum marianum L.*). *Toxicol. Ind. Health.*
- Ait-Ouazzou A., Lorán S., Arakrak A., Laglaoui A., Rota C., Herrera A., Pagán R. & ConchelloP., 2012:**Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Res. Int.* 45: 313–319.
- Ali S.S., Kasoju N., Luthra A., Singh A., Sharanabasava H., Sahu A. & Bora U., 2008:** Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International Journal*, 41: 1.
- Ames B.M., 1983:** Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radical and degenerative diseases. *Science.* 221: 1256–1263.
- Amina Taalbi. , 2015 :** Variabilité chimique et intérêt économique des huiles essentielles de deux menthes sauvages : *Mentha pulegium* (Fliou) et *Mentha rotundifolia* (Domrane) de l'ouest algérien.
- André R., 1998 :** La maladie de parkinson. Ed. Masson. 16-19.
- Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides E., Mc Donald S. et Robards K., 2002:** Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.
- Anton R. et Lobstein A., 2005 :** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et **huiles essentielles**. **Tec & Doc, Paris, 522p.**
- Arfa B.A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N. & Chalier P., 2006.** Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.* **43:** 149–154.
- Aruoma O.I., 1998:** Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of American Oil Chemist Society* 75: 199-212.
- Aruoma O.I., 1998:** Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of American Oil Chemist Society* 75: 199-212.
- Aurousseau B., 2002 :** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA. Product of Animal.* 15: 67-82.
- Baba Aissa F., 2000 :** Encyclopédie des plantes utiles, librairie moderne, Rouïba, 368.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D.et Idaomar, M., 2008:** Biological effects of essential oils. *Food and chemical toxicology.* 46 : 446-475.

- Bakkali, F., S., Averbek, D. et Idaomar, M., 2008:** Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 446-475.
- Barel S., Segal R. et Yashphe J., 1991:** The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. *J. Ethnopharmacol.* 33: 187-191.
- Bartosz G., 2003:** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicol*, 9, 5-21.
- Baser K. H. C., ET Buchbauer G., 2010:** handbook of essential oils: Science, *terminology and applications*. CRC press.UK.
- Baser KHC. Et Buchbauer G., 2010:** Handbook of Essential oils: Science, Technology and Applications. CRC Press. UK.
- Beckman K. B. et Ames B. N., 1998:** The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* (78): 574- 581.
- Beghidja N., Bouslimani N., Benayache F., Benayache S. & Chalchat J.C., 2007:** Composition of the oils from *Mentha pulegium* grown in different areas of the east of Algeria. *Chem. Nat. Comp.* 43: 481-483.
- Béjaoui A., Boulila A. & Boussaid M., 2013a.** Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *Origanum vulgare subsp. glandulosum Desf.* from Tunisia. *J. Med. Plants Res.* 7: 2429-2435.
- Bekhechi C., 2008. :** Analyse des huiles essentielles de quelques espèces aromatiques de la région de Tlemcen par CPG, CPG-SM et RMN 13 C et étude de leur pouvoir antibactérien. Thèse Doctorat. Univ. Tlemcen, 205 p.
- Belaiche P., 1979 :** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie Tome 1: L'Aromatogramme , Ed. Maloine, France.204 p.
- Belaiche P., 1979.** « Traité de phytothérapie et d'aromathérapie Tome 1: L'Aromatogramme », Ed. Maloine, France. 204 p.
- Beloued A., 1998 :** Plantes médicinales d'Algérie. Dép De Botanique A L'institut National agronomique d'El-Harrach-Algérie .P277 .
- Benabdallah A., 2008 :** Contribution à l'étude histologique, phytochimique et antimicrobienne d'une plante aromatique et médicinale: *Mentha pulegium L.* Thèse de Magister, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie.
- Benayad N., 2008 :** Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Projet de recherche. Faculté des Sciences Rabat, Maroc.
- Benayad N., 2013 :** Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales Marocaines. Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes Marocaines et activité anticancéreuse. Thèse, faculté des sciences, Université de Mohammed V – AGDAL. 186 p.
- Benbouali M., 2006 :** Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de□., *Mentha rotundifolia* et *Thymus vulgaris*, Mémoire de magister, Université Hassiba Ben Bouali, Chlef.
- Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., McAllister T.A. et al. , 2008 :** Plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*. 145: 209–228.
- Benet E., 1988,** Etudes physiologiques de *Fusarium moniliforme* en Nouvelle Calédonie ; centre national d'études agronomiques des régions chaudes école supérieure d'agronomie tropicale de Montpellier.

- Besombes C., 2008.** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermomécanique d'herbes aromatiques, Applications généralisées. Thèse de Doctorat. Université de La Rochelle. France.
- Bessedik Majdeddine., et Larbi Khenfer Benhaoua., 2015 :** Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles d'Eucalyptus globulus et Thymus algeriensis contre quelques champignons phytopathogènes des palmes du palmier dattier (Phoenix dactylifera L).thèse de master, Université Kasdi Merbah Ouargla. Département des Sciences Biologiques Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. 93 p.
- Bortolomeazzi R., Sebastianutto N., Toniolo R. and Pizzariello A., 2007:** Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chem.*100: 1481-1489.
- Botineau M., 2010 :** botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. *Ed TEC&DOC, la voisier*, pari.1021-1043p.
- Bouchra C., Achouri M., Idrissi Hassani LM.et Hmamouchi M., 2003:** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Phytochem.* 89: 165-69.
- Bouhaddouda N., 2015:** Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local :Origanum vulgare et Mentha pulegium these , Université Badji Mokhtar-Annaba ,205p .
- Boyd B., Ford C., Koepke M.C., GaryK., Horn E., McAnalley S. et McAnalley B. 2003 :** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience& Nutrition.* 4 (6):7. (cited in Mohammedi Z, 2005).
- Bozin B., Mimica-Dukic N., Simin N.et Anackov G., 2006:** Characterization of the volatile composition of essential oil of some lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.*54: 1822-1828.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. et BersetC., 1995:** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 25-30.
- Bremness L., 2001 :** plantes aromatiques et médicinales. BORDAS, France, 303.
- Bruneton J., 1999 :** «pharmacognosie», Plantes médicinales, Ed. Lavoisier, Techniques et Documentation, Paris, 405.
- Bruneton J., 1993 :** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.p: 915.
- Bruneton J., 1999 :** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. Tec. Et Doc. Lavoisier. 3eme édition. 1999, P: 484- 488 .
- Bruneton J., 1999 :** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème éd. Ed. Tec & Doc, *La voisier*, Paris.
- Bruneton J., 1999 :** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- Burda S. et Oleszek W., 2001:** Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem*, 49 (6), 2774-2779.
- Burt S., 2004:** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.
- Burt S., 2004:** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food and Microbiology.* 94: 223-253.
- Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., and Ferret A., 2007:** Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science.* 90: 2580–2595.

- Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A., Akpulat HA. et 2003:** Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* 87: 215-220.
- Carson C.F. & Riley T.V., 1995.** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Food Microbiol.* 78: 264–269.
- Catier O. et Roux D., 2007:** Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3eme édition. Cahiers du préparateur en pharmacie. Ed. ISBN. Wolters Kluwer. Pp. 77- 79/81-82.
- Chalchat J.C., Gorunovic M.S., Maksimovic Z.A. & Petrovic S.D., 2000:** Essential oil of wild growing *Mentha pulegium* L. from Yugoslavia. *J. Essent. Oil Res.* 12: 598–600.
- Chebli B., Achouri M., Idrissi Hassani L.M. et Hmamouchi M., 2003:** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr, *J. Ethnopharmacol.*, 89, 165-169.
- Clevenger J. F., 1928.** Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type ». *American Perfumer et Essential Oil.* 17 (4) 346-351.
- Clevenger J. F., 1928:** Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type ». *American Perfumer et Essential Oil.* 17 (4) 346-351.
- Cowan M.M., 1999: Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4): 564- 582.
- Cristani M., D'arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G. & Micieli D., 2007:** Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with modal membranes, Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 6300-6308.
- Da Cruz-Cabral, L., Fernandez-Pinto, V. et Patriarca, A., 2013 :** *Int J Food Microbiol.* 166, 1-14.
- Dacosta Y., 2003 :** Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta, Paris, p. 317.
- Derwich E., Benziene Z. & Taouil R., 2010.** GC/MS analysis of volatile compounds of the essential oil of the leaves of *Mentha pulegium* growing in Morocco. *Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara).* 55(69): 103-106.
- Derwich E., Benziene Z. & Taouil R., 2010:** GC/MS analysis of volatile compounds of the essential oil of the leaves of *Mentha pulegium* growing in Morocco. *Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara).* 55(69): 103-106.
- Dorman HJ., Kosar M., Kahlos K., Holm Y., Hiltunen R. et Agric J., 2003:** *Food Chem.* 51, 4563.
- Dorman HJ., Kosar M., Kahlos K. et al., 2003:** Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. *J Agric Food Chem* 51:4563– 9654 .
- Dorman HJD. et Deans SG., 2000 :** Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology.* 88(3): 308-316.
- Doumbouya M., Abo k., Lepengue A.N., Camara B., Kanko K., Aidara D. et Kone D., 2012.** Activités comparées in vitro de deux fongicides de synthèse et de deux huiles essentielles, sur des champignons telluriques des cultures maraîchères en Côte d'Ivoire. *J. Appl. Biosciences ;* 50: 3520-3532.
- Duh P.D., 1999.** Antioxidant activity of water extract of four Harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) varieties in soybean oil emulsion. *Food Chem.* 66: 471–476.

- Duraffourd C., Lapraz J-C. et Chemli R. ; 1997** : La plante médicinale de la tradition à la science. 1er congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris, 222.
- El Abed D. et Kambouche N., 2003**: Les huiles essentielles. Edition Dar el Gha
- El-Ghorab AH., 2006**: The chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil from Egypt and its antioxidant activity. J. Essential oil Bearing Plants, 9: 183–195.
- Essawi T. & Srour M., 2000**: Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. J. Ethnopharmacol. 70: 343–349.
- Favier A., 2006** : Stress oxydant et pathologies humaines. Ann. Pharm. Fr.; 64: 390-396.
- Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh SA ., Rasooli I., 2007** : *Food chem* . 102 : 898-904 .
- Gamisans J. et Jeanmonod D., 1993** : Catalogue des plantes vasculaires de la Corse, secondes édition, Edition des conservatoires et jardins botaniques de la ville de Genève, Chambésy, 1993.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. et Jore D., 2003** : Espèces réactives de l’oxygène : Comment l’oxygène peut-il devenir toxique ? Mécanismes biochimiques, p 91-96.
- Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V.M., Azzolini Ana ECS. Et Fonseca Maria J.V., 2003**: Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. American Association of Pharmaceutical Scientists. 2: 5p
- Giordani R., Hadeif Y., Kaloustian J., 2008** : Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia* ,79 : pp199-203.
- Guignard J. L., Dupont F., 2004** : Botanique: Systématique moléculaire. 13^{ème} éd. Masson, pp237.
- Guignard, J. L., 2000** : « Biochimie végétale », Masson, Paris, 166.
- Guinoiseau E., 2010** : Molécules, antibactérienne issues d’huiles essentielles : séparation, identification et mode d’action. Thèse de Doctorat de l’Université de Corse, option : Biochimie- Biologie moléculaire, France, 50p.
- Haddouchi F., Lazouni HA., Meziane A. et Benmansour A., 2009** : Etude physicochimique et microbiologique de l’huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. Afrique SCIENCE. 05(2): 246 – 259.
- Hajlaoui H., Trabelsi N., Noumi E., Snoussi M., Fallah H., Ksouri R. et Bakhrouf A., 2009**: Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 2227-2238.
- Hajlaoui H., Trabelsi N., Noumi E., Snoussi M., Fallah H., Ksouri R., & Bakhrouf A., 2009**: Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 2227–2238.
- Hajlaoui H., Trabelsi N., Noumi E., Snoussi M., Fallah H., Ksouri R., & Bakhrouf A., 2009**. Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 2227–2238.
- Hogan D. & Kolter R., 2002**: Why are bacteria refractory to antimicrobials. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 272–4.
- Hyerisam. , 2013** : Propriétés médicinales de la menthe pouliot. (*Mentha pulegium.L*)
- Il Edrissi A., 1982** : Thèse de troisième cycle: Etude des huiles essentielles de quelques Espèces *Salvia*, *Lavandula* et *Mentha* du Maroc, Faculté des Sciences de Rabat, Maroc, 18-22 .

- Inouye S., Takazawa T. et Yamaguchi H., 2001:** Antimicrobial activity of the essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antibacterial Chemotherapy*. **47**: 565-573.
- Jacques G. et Paltz S.A., 1997 :** Le fascinant pouvoir des huiles essentielles. Fascicule du laboratoire "Jacques Paltz". 114.
- Jafri MA., Farah. Javed K., et Singh S., 2001:** Evaluation of the gastric antiulcerogenic effect of large cardamom (fruits of *Amomum subulatum* Roxb). *J. Ethnopharmacol.* **75**: 89-94.
- Jahandiez E. et Marie R., 1934 :** Catalogues des plantes du Maroc, Spermatophytes et ptérydophytes. Tome III, P. Lechevalier, librairie 12, rue de Tournon VIe, Alger Paris, 42.
- Kalemba D. & Kunicka A., 2003:** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. **10**: 813-829. 6.
- Kamkar A., Javan A.J., Asadi F. & Kamalinejad M., 2010:** The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food Chem. Toxicol.* **48**: 1796–1800.
- Karaman I., Şahin F., Gulluce M., Özütcü H., Şengül M. & Adıgüzel A., 2003:** Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J. Ethnopharmacol.* **85**: 231–235.
- Karioti A., Vrahimi-Hadjilouca T., Droushiotis D., Rancic A., Hadjipavlou-Litina D. et Skaltsa H., 2006:** Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Med.* **72**: 1330- 1334.
- Kataoka H., Lord H.L. et Pawliszyn J., 2000:** *Journal of Chromatography A.*, **880**, 35. Arômes library of Laboratory of Chemistry of Natural Products. University of Corse, Corte, France. UMR CNRS 6134, (1987–2011).
- Kebissi H., 2004 :** Encyclopédie des herbes et plantes médicinales, Dar Al-Kotob Al-Ilyah, Berouth-Liban, 56
- Kellouche A., 2005 :** Etude de bruche du poi-chiche, *Callosobruchus muculatus* (Coleoptera : bruchidae) : Biologie, physiologie, reproduction et lutte, Thèse. Doc d'état. Univ. Tizi-Ouzou Boyd B., Ford C., Koepke M.C., Gary K., Horn E., McAnalley S., and McAnalley B. (2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition*. **4** (6):7. (Cited in Mohammedi Z, 2005). Algérie, 154p.
- Kheyer N., Meridja D. et Belhamel K., 2014 :** Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia. *Algerian Journal of Natural Products*. **2**(1): 18-26.
- Kim J., Marshall M. R., et Vei C., 1995:** Antibacterial activity of some essential oil components against five food borne pathogens. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, pp: 2839-2845.
- Kimbaris A.C., Siaty N.G., Daferera D.J., Tarantilis P.A., Pappas C.S. et Polissiou M.G., 2006:** Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrason Sonochem.* **13**: 54-60.
- Knobloch KA., Pauli B., Iberl H., Weigand N. et Weis., 1989:** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. of Ess. Oil Res.* **1** : 119-123
- Kofidis G., Bosabalidis A., Kokkini S., Essent J. et Oil Res., 2004 :** 16, 469 .
- Kokkini S., Handilou E., Karousou R. et Lanaras T., 2002:** Variations of pulegone content in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) plants growing wild in Greece. *J. Essent. Oil Res.* **14**: 224- 227.

- Kokkini S., Hanlidou E., Karousou R. & Lanaras T., 2004:** Clinal variation of *Mentha pulegium* essential oils along the climatic gradient of Greece. *J. Essent. Oil Res.* 16: 588-593.
- Kurita N., myaji M., kurane R., Takahara Y. et Ichimara K., 1979:** Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds from oils of higher plants. *Agric. Boil. Chem.* 43: 2365-2371.
- Lahlou N., Mounchid K., Aboussaouira T., Habti N., Belghazi L., Fellatzarrouk K., Tantaoui- Elaraki A., Rachidai A. et Ismaili-Alaoui M.M., 2005 :** Étude de la cytotoxicité de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* : essais biologiques variés, *Les cahiers de la recherche, A* (6), 7-16.
- Lahrech K., 2010 :** "Extraction et analyses des huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. et de *Saccocalyx satureioides*. Tests d'activités antibactériennes et antifongiques," Theses, Université d'Oran Es-Senia, Oran.
- Lahrech K., 2010 :** "Extraction et analyses des huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. et de *Saccocalyx satureioides*. Tests d'activités antibactériennes et antifongiques," Theses, Université d'Oran Es-Senia, Oran.
- Lopez P., Sanchez C., Batlle R. et Nerin C., 2005:** Solid and vapor phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected food borne bacterial and fungal strains. *J. Agric. Food Chem.* 53: 6939-6946.
- Maataoui B. S. et al. ,2006 :** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du Figuier de Barbarie (*Opuntia Ficus indica*), *Lebanese Science Journal*, Vol. 7, n° 1 : 1-8.
- Mahadevan J., 1982:** Biochemical aspects of plant disease resistance, Part I: Performed inhibitory substances. Today and Tomorrow Printers and Publishers, New Delhi, India, pp: 425-431.
- Mahboubi M. & Haghi G., 2008.** Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 119: 325–327.
- Mahboubi M. & Haghi G., 2008:** Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 119: 325–327.
- Mansouri Nazik., Satrani Badr ., Ghanmi Mohamed ., El ghadraoui Lahsen ., Guedira Abdehamid ., Aafi abderaman.,2001:** composition chimique , activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Juniperus communis* du Maroc . *Bulletin de la société royale des sciences de liege* , vol . 80. P.791-805.
- Mantle D., Anderton JG., Falkous G., Barnes M., Jones P. et Perry EK ., 1998:** Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 121: 385-391.
- Marc Fr., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C. et all., 2004:** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S: médecine sciences*, 20(4), 458-463.
- Mbarek LA., Mouse HA., Elabbadi N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R., Benharref A., Chait A., Kamal M., Dalal A. et Zyad A., 2007:** Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. Anti-tumor effect of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40: 839-847.
- Mejholm O. & Dalgaard P., 2002:** Antimicrobial effects of essential oils on the seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products, *Letters in Applied Microbiology*, 34, pp : 27-31.
- Meryem Alaoui Boukhris., 2009 :** Activités larvicides des extraits de plantes sur les larves de moustiques vecteurs de maladies parasitaires. Thèse, Faculté des sciences et des techniques, Fès
- Molyneux P., 2004:** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26(2): 211-219.

- Nanjo F., Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M. et Hara Y., 1996: Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Md*, 21(6), 895-902.
- Narishetty, S.T.K., Panchagnula, R., 2004: *journal of controlled release* 95, 367-379.
- Nikaido H. & Vaara M., 1985: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49: 1-32.
- Nikaido H., 2003: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(4): 593-656
- O.M.S., 2002: Organisation Mondiale de la santé (OMS) Rapport sur la médecine traditionnelle : Besoins et potentiel. N° 4. 6 p.
- Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z. & Nalhdibadi, H., 2007: Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18: 1518-1523.
- Ouibrahim Amira., 2014: Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis L.*, *Ocimum basilicum L.* et *Rosmarinus officinalis L.*) de l'Est Algérien.
- Ouraini D., Agoumi A., Ismaili-Alaoui M., Alaoui K., Cherrah Y., Alaoui M.A. et Belabbas M.A., 2007: Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides L.* et *Mentha pulegium L.*, comparée aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques, *Phytothérapie*, 1, 6-14.
- Ouraini D., Agoumi A., Ismaili-Alaoui M., Alaoui K., Cherrah Y., Amrani M. et Alaoui Belabbas M., 2005: Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes, *Phytothérapie*, 4, 147-157.
- Panetta F. D., 1985: Population study on pennyroyal mint (*Mentha pulegium L.*) I: Germination and seeding establishment. *Weed Research U. K.*, 4: 301 - 309.
- Parejo L., Viladomat F., Bastida J., Rosas-Romero A., Flerlage N., Burillo J. et Codina C., 2002: Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem.* 50: 6882-90.
- Quézel P. & Santa S., 1962: Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1. CNRS. Ed. Paul Le chevalier, Paris.
- Quézel P., & Santa S., 1963: Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. CNRS, Paris.
- Rahili G., 2002: Les huiles essentielles et leur intérêt. La forêt algérienne n°4. Institut national de la recherche forestière. Bainem Alger.
- Rahman A.U., Nasim S., Baig I., Jalil S., Orhan I., Sener B. et Choudhary M.I., 2003: Antiinflammatory isoflavonoids from rhizomes of *Iris germanica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 2-3: 177-180.
- Ranga R. R., Tiwari A. K., Prabhakar R. P., Suresh B. K., Ali A. Z., Madhusudana K. et Madhusudana R. J., 2009: New furanoflavonoids, intestinal alpha-glucosidase inhibitory and free-radical (DPPH) scavenging, activity from antihyperglycemic root extract of *Derris indica* (Lam.). *Bioorg. Med. Chem.* 17: 5170-5175.
- Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D., Gachkar L., Allameh A. et Rezaei, M.B. *Food Chem.*, 2008: 135-140.
- Raybaud E., 1985: Critique de la systématique des menthes. *Thèse de Doctorat d'état*, faculté de pharmacie, Marseille.

- Remmal A., Tantaoui-Elaraki A., Bouchikhi T., Rhayour K .et Ettayebi M., 1993:** improve method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J. Ess. Oils Res.* 5:179-184.
- Reichling J., Suschke U., Schneele J. & Geiss H.K., 2006.** Antibacterial activity and irritation potential of selected essential oil components-structure-activity relationship. *Nat. Prod. Commun.* 1: 1003-1012.
- Rozman T. et Jersek B., 2009:** *Acta agriculturae sloveniaca*, 93 (1) :51-580.
- Ruberto G. & Baratta M.T., 2000.** Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 69: 167–174.
- Ruberto G. & Baratta M.T., 2000:** Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 69: 167–174.
- Şahin F., Karaman I., Gulluce M., Özütcü H., Şengül M., Adıgüzel A., Öztürk S. & Kotan R., 2002:** Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. *J Ethnopharmacol.* 87: 61–65.
- Samia Aouadhi., 2010 :** Faculté de médecine de Tunis - Master spécialisé en toxicologie MIMOIR atlas.
- Sanchez-Moreno C., 2002:** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Int. J. of FoodsSci. Tech.* 8: 121-137.
- Santoyo S., Cavero S., Jaime L., Ibanez E. and Senorans F.J. & Reglero G., 2005:** Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection.* 68: 790-795.
- Scherer, R. and Godoy, H.T. 2009.** Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, vol. 112,
- Siani AC., Ramos MF., Menezes-de-Lima O Jr., Ribeiro-dos-Santos R., Fernandez-Ferreira E., Soares RO., Rosas EC., Susunaga GS., Guimaraes AC., Zoghbi MG. et Henriques MG ., 1999:** Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J. Ethnopharmacol.* 66: 57-69.
- Silva L F., Cardoso M. das G., Batista L. R., Gomes M. de S., Rodrigues L. M. A., Rezende D. A. de C. S., Teixeira M. L., Carvalho M. S. S., Santiago J. de A. et Nelson D. L., 2015:** “Chemical characterization, antibacterial and antioxidant activities of essential oils of *Mentha viridis* L. and *Mentha pulegium* L. (L),” *Am. J. Plant Sci.*, vol. 6, pp. 666–675.
- Sipailiene A., Venskutonis P.R., Baranauskiene R. & Sarkinas A., 2006:** Antimicrobial activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. *J. Essent. Oil Res.* 18: 698-703.
- Tapondgou L. A., Adler C., Bouda H., et Fontem D. A., 2003 :** Bioefficacité des poudres et des huiles essentielles des feuilles de *Chenopodium ambrosioides* et *Eucalyptus saligna* à l’égard de la bruche du niébé, *Callosobruchus maculatus* Fab (Coleoptera, Bruchidae). *Cahiers d’études et de recherches francophones, Agricultures*, 12(6), pp : 401-407.
- Umezu T., 1999:** Anticonflict effects of plant-derived essential oils. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64: 35-40.
- Unlu M., Daferera D., Donmez E., Polissiou M., Tepe B. et Sokmen A., 2002:** Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae) *J. Ethnopharmacol.* 83: 117-121.
- Vagi E., Simandi B. et Suhajda ., 2005:** Hethelyi. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum marjorana* L. Extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *J.*, 38, 51-57.

- Vilela G. R., Almeida G. S., Regitano D'ARCE M. A. B., Moraes M. H.D., Brito J. O., DA Silva M. F. G.F., Silva S.C., Piedade S.M.S., CALORI-DOMINGUES M. A. et Gloria E. M., 2009:** Activity of essential oil and its major compound, 1,8- cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare, *J. Stored Prod. Res.*, 45, 108-111.
- Wang W., Li N., Luo M., Zu Y. et Efferth T., 2012:** Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil Compared to that of its main component. *Molecules*. **17**: 2704-271.
- Wang W., Wu N., Zu Y.G. & Fu Y.J., 2008:** Antioxydative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food chem.* 108: 1019-1022.
- Yi Z., Yu Y., Liang Y. and Zeng B., 2008:** In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT*. 41, 597-603.
- Yoshimura H., Sawai Y., Tamotsu S. et Sakai A., 2010:** 1, 8-cineole inhibits both proliferation and elongation of BY-2 cultured tobacco cells, *J Chem Ecol.*, 1-9.
- Zekri N., Amalich S., Boughdad A., El Belghiti M.A. & Zair T., 2013:** Phytochemical study and insecticidal activity of *Mentha pulegium* L. oils from Morocco against *Sitophilus oryzae*. *Mediterr. J. Chem.* 2(4): 607-619.
- Zargari A., 1990:** Herbal Medicines. Publication of Tehran University, Iran. pp: 14-18
- Delille L., 2007 :** Les plantes médicinales d'Algérie. Berti Editions, Alger. 240 p.
- Zergat F., 1996 :** Contribution à l'Etude de la Production d'Acide Citrique par *Aspergillus niger* Cultivée sur Moût de Dattes. Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie saharienne, Université Kasdi Merbah, Ouargla .
- Zhao R.J., Koo B.S., Kim G.W., Jang E.Y., Lee J.R., Kim M.R., Kim S.C., Kwon Y.K., Kim K.J., Huh T.L., Kim D.H. Et Shim I. et Yang C.H., 2005:** The essential oil from *Angelica gigas* NAKAI suppresses nicotine sensitization. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 2323-2326.
- Zwaving J.H. & Smith, D., 1971:** Composition of the essential oil of Austrian *Mentha pulegium*. *Phytochemistry*. 10: 1951-1953.

Annexes

ANNEXE 1

Appareillage, verrerie et consommables, milieux de culture

▪ **Appareillage**

- Autoclave
- Balance de précision
- Balance de paillasse
- Bec bunsen
- Chauffe ballon 1 L
- Cryostat
- Etuve isotherme
- Hotte à flux laminaire avec lampe UV
- Hydrodistillateur type Clevenger
- incubateur bactériologique (25°C, 35°C, 42°C)
- Plaque chauffante
- Spectrophotomètre
- Vortex

▪ **Verrerie et consommable**

- Anse de platine
- Ballons à fond plat à col rodé
- Bêchers : 100 ml, 250 ml, 500 ml
- Boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre
- Disques d'antibiotiques
- Disques d'aromatogramme Whatman n°1, 6 mm
- Écouvillons Stériles
- Eprouvettes
- Erlenmeyer 100 ml, 250 ml
- Fioles
- Flacons avec bouchon
- Pincés
- Pipettes graduées stériles
- Pipettes Pasteurs
- Seringues

- Spatule inox
- Tubes à essai
- Verres de montre

▪ **Solutions et réactifs**

- 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH)
- Butylated hydroxytoluene
- Eau distillée
- Eau physiologique
- Ethanol 95°, 96°.
- Dimethyl sulfoxide

▪ **Milieux de culture**

- PDA (Potato dextrose agar)
- Milieu Miller Hinton (MH)
- Eau physiologique
- Gélose de conservation
- Bouillon Gélose nutritive
- Milieu Gélose nutritive (GN)

Résumé

Notre travail porte sur l'étude des activités biologiques des huiles essentielles (HES) de la menthe pouliot (*Mentha pulegium* L.) de la région de Bordj Bou Arreridj.

Mentha pulegium L. provenant de la région de Bordj Bou Arreridj a fait l'objet d'un décodage biologique de ses huiles essentielles. Cette plante appartient à la famille des lamiacées ; la famille la plus importante dans la flore algérienne et la plus utilisée par les thérapeutes traditionnels.

L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation a donné un rendement de $0.64 \pm 0.01\%$.

L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH, en comparant avec l'antioxydant de référence BHT ($IC_{50} = 29 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ et $AAI = 1.35$) les résultats montrent que les huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. ont une activité antioxydante modérée dont IC_{50} égale à $6.7 \pm 0.28 \text{ mg/ml}$ et un AAI de 0.005.

L'étude du pouvoir antibactérien *in vitro* par la méthode de diffusion des disques a démontré une bonne activité antibactérienne contre les souches testées soit bactériennes (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *M. luteus*, *S. aureus*, *B. subtilis*) soit fongique (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Fusarium moniliform*).

Ces résultats peuvent être considérés comme point de départ pour des applications de cette plante en santé ou dans le secteur agroalimentaire

Mots clés : *Mentha pulegium* L., les huiles essentielles, activité antioxydante, activité Antibactérienne, activité antifongique.

ملخص

الهدف من هذا البحث هو دراسة النشاط البيولوجي للزيوت الأساسية لنبات الفليو *Mentha pulegium* من منطقة برج بو عريريج. الفليو هو نبات عطري ينتمي إلى عائلة الشفويات يدعى محليا بالفليو. ينمو بصورة تلقائية وهو منتشر بكثرة في الجزائر وفي الطب التقليدي

تم استخلاص الزيوت الأساسية عن طريق عملية التقطير البخار hydrodistillation، والتي أعطت مردود يساوي 0.01 ± 0.064 .

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستعمال تقنية DPPH حيث بينت النتائج ان الزيوت الأساسية المستخلصة *mentha pulegium* ذات نشاطية معتدلة ب ($IC_{50} = 6,7 \pm 0,28 \text{ mg/ml}$ و $AAI = 0,005$) مقارنة ب BHT ($IC_{50} = 29 \pm 0,13 \text{ mg/ml}$; $AAI = 1,35$). أظهرت الدراسة ان لهذه الزيوت نشاطية كبيرة مضادة للبكتيريا المختبرة و المتمثلة في *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* ; *Bacillus subtilis* ; *Pseudomonas aeruginosa* وذلك باستعمال طريقة الانتشار في وسط هلامي حيث لوحظ ان هذا التأثير مرتبط بالتركيز.

من جهة أخرى بينت النتائج باستعمال طريقة الاحتكاك المباشر ان للزيوت الأساسية نشاطية مضادة للفطريات التالية *moniliform* *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus* ; *Fusarium*

الكلمات المفتاحية : *Mentha pulegium* L.، الزيوت الأساسية، النشاط المضاد للأكسدة، النشاطية المضادة للبكتيريا، النشاطية المضادة للفطريات.